



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

ULB

# Potential hyperaktiver Gerinnungsfaktor IX Varianten für den Einsatz in der Hämophilie B Therapie

Urbanowitz, Ann-Kathrin  
(2020)

DOI (TUprints): <https://doi.org/10.25534/tuprints-00014421>

Lizenz:



CC-BY-SA 4.0 International - Creative Commons, Namensnennung, Weitergabe unter gleichen Bedingungen

Publikationstyp: Dissertation

Fachbereich: 10 Fachbereich Biologie

Quelle des Originals: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/14421>

---



# **Potential hyperaktiver Gerinnungsfaktor IX Varianten für den Einsatz in der Hämophilie B Therapie**

**Vom Fachbereich Biologie  
Der Technischen Universität Darmstadt**

Zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Dissertation

von Ann-Kathrin Urbanowitz

Erstgutachterin: Prof. Dr. Beatrix Süß

Zweitgutachter: Prof. Dr. med Halvard Bönig

Darmstadt 2020

Urbanowitz, Ann-Kathrin: Potential hyperaktiver Gerinnungsfaktor IX Varianten für  
den Einsatz in der Hämophilie B Gentherapie  
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,  
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2020  
URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-144214  
Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2020  
Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International  
<https://creativecommons.org/licenses/>

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Hämophilie .....	1
1.1.1	Klinische Manifestation .....	1
1.1.2	Substitutionstherapie .....	3
1.2	Gerinnungsfaktor IX (FIX) .....	4
1.2.1	Die Gerinnungskaskade .....	4
1.2.2	FIX-Struktur .....	7
1.2.3	Interaktion von FIX mit Kollagen Typ IV .....	11
1.2.4	FIX Padua.....	13
1.3	Gentherapie der Hämophilie B .....	14
1.3.1	Adeno-assoziierte Viren (AAV).....	14
1.3.2	Klinische Studien .....	17
1.3.3	Immunantworten ausgelöst durch die AAV Gentherapie .....	20
1.4	Zielsetzung der Arbeit .....	24
2	Material und Methoden .....	27
2.1	Chemikalien und Reagenzien .....	27
2.2	Lösungen und Puffer.....	29
2.3	Enzyme, Antibiotika und Antikörper.....	32
2.4	Plasmid .....	33
2.5	Kommerziell erhältliche Kits .....	34
2.6	Zelllinien und Kulturmedien.....	35
2.7	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.7.1	Bakterienkultur und Transformation .....	36
2.7.2	Plasmid Präparation .....	36
2.7.3	Restriktionsverdau .....	37
2.7.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	37
2.7.5	Gelextraktion von DNA-Fragmenten .....	38
2.7.6	DNA-modifizierende Enzyme und Klonierungstechniken.....	38
2.7.7	Sequenzierung .....	39
2.7.8	Zielgerichtete Mutagenese.....	40
2.7.9	Klonierung von pCCL_CMV_FIX_WT, Padua, LW und K LW .....	41
2.7.10	Klonierung von pscAAV_ITR2_LP1N_hucoFIX_WT/Padua/LW /K LW_SV40pA .	42
2.7.11	<i>Quantitative Real-Time PCR</i> (qPCR) .....	42
2.8	Zellkultur .....	44
2.8.1	Zellkulturbedingungen .....	44
2.8.2	Lentivirus Produktion .....	44
2.8.3	Generierung der Zelllinien HEK293T/WT, HEK293T/Padua, HEK293T/LW und HEK293T/K LW .....	45
2.8.4	Produktion von Adeno-assoziierten-Viren (AAV).....	45
2.9	Proteinbiochemische Methoden .....	47

2.9.1	Aufreinigung der FIX Proteinvarianten mittels Anionen-Austausch-Chromatographie .	47
2.9.2	Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay.....	48
2.9.3	FIX <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	49
2.9.4	Kollagen Typ IV <i>solid phase binding Assay</i> .....	49
2.9.5	FIX IgG1 Antikörper ELISA.....	50
2.9.6	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) .....	50
2.9.7	Nicht aktivierte partielle Thromboplastinzeit (naPTT).....	51
2.9.8	Chromogener Assay gegen FIX und FIXa .....	51
2.9.9	SDS (Sodium-dodecyl-sulfat) Gelelektrophorese .....	52
2.9.10	Western Blot .....	52
2.9.11	Intrazelluläres Trafficking .....	53
2.9.12	Immunpräzipitation .....	54
2.9.13	Immunhistochemie .....	54
2.9.14	Bestimmung der Thrombogenität .....	55
2.10	Mausexperimente .....	56
2.10.1	Mausstamm .....	56
2.10.2	Retroorbitale Blutentnahme.....	56
2.10.3	<i>Tail Clip Assay</i> .....	57
2.10.4	Immunogenität der FIX Varianten .....	58
2.10.5	Pharmakokinetik nach intravenöser und subkutaner Injektion .....	59
2.10.6	AAV Gentherapie von Hämophilie B Mäusen.....	60
2.11	Statistik .....	61
3	Ergebnisse .....	63
3.1	Generierung und Charakterisierung hyperaktiver FIX Varianten <i>in vitro</i> .....	63
3.1.1	Generierung hyperaktiver FIX Varianten .....	63
3.1.2	Glykosylierung und Sezernierung der FIX Varianten .....	68
3.1.3	Aufreinigung der FIX Varianten.....	70
3.1.4	Funktionalität der aufgereinigten FIX Varianten .....	74
3.2	Immunogenes Potential der FIX Varianten.....	77
3.3	Einfluss der verminderten Kollagen Typ IV Bindung auf die Pharmakokinetik der FIX KLW Variante .....	80
3.3.1	Pharmakokinetik nach subkutaner Injektion .....	80
3.3.2	Pharmakokinetik nach intravenöser Injektion .....	82
3.4	Effizienz der hyperaktiven FIX Varianten in der AAV Gentherapie .....	86
3.4.1	AAV Gentherapie in der niedrigen Dosis ( $5 \times 10^{10}$ vg/kg) zur Überprüfung der Effizienz .	86
3.4.2	AAV Gentherapie in der hohen Dosis ( $2 \times 10^{11}$ vg/kg).....	91
4	Diskussion .....	99
4.1	Generierung und <i>in vitro</i> Charakterisierung der Hyperaktiven FIX Varianten .....	99
4.2	Erhöhung der Immunogenität durch Einzelnukleotid Austausche der FIX Varianten	104
4.3	Einfluss der verminderten Kollagen Typ IV Bindung auf die Pharmakokinetik von FIX .....	107

4.4	Effizienz hyperaktiver FIX Varianten in der AAV Gentherapie .....	112
5	Literaturverzeichnis .....	119
6	Anhang .....	144
6.1	Abkürzungen.....	144
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	148
6.3	Tabellenverzeichnis .....	149
7	Danksagung .....	150
8	Erklärung.....	152
9	Lebenslauf .....	153
10	Publikationen und Kongressteilnahme.....	155



## Zusammenfassung

Die Hämophilie ist eine X-chromosomal vererbte Blutgerinnungsstörung und kann aufgrund des Mangels an Gerinnungsfaktor VIII oder FIX in die Hämophilie A respektive Hämophilie B unterschieden werden (129). Die Unterteilung in die Schweregrade schwer, moderat und mild beeinflusst sowohl die klinische Manifestation als auch die Langzeitprognose für die Patienten (214). Insbesondere bei der schweren Verlaufsform der Hämophilie wird eine prophylaktische Substitution der Patienten mit dem jeweiligen fehlenden Gerinnungsfaktor angestrebt, mit dem Ziel den Schwellenwert der Gerinnungsfaktorspiegel im Plasma stets über 1% zu halten und somit das Auftreten von spontanen Blutungen in Muskeln und Gelenke weitestgehend zu verhindern (57;199). Aufgrund der geringen Halbwertszeit von maximal 24 Stunden für FIX müssen sich die Patienten zwei- bis dreimal wöchentlich dieser Substitutionsprozedur unterziehen, was nicht nur eine Einschränkung der Lebensqualität zur Folge hat sondern darüber hinaus auch ein gesundheitliches Risiko darstellt (117;124). Daher wurde die Entwicklung einer Gentherapie zur Behandlung der Hämophilie in den letzten Jahren progressiv vorangetrieben. Die Hämophilie bietet dahingehend zweierlei Vorteile: zum einen handelt es sich um einen monogenetischen Defekt und zum anderen haben geringe Korrekturen der Gerinnungsfaktor Aktivitäten bereits einen enormen Einfluss auf die klinische Prognose für die Patienten. Das ursprüngliche Ziel, den Schwellenwert der Gerinnungsfaktor Aktivität über 1% zu halten, wurde bereits durch diverse Optimierungsprozesse, wie der Verwendung von selbstkomplementären und leberspezifischen AAV Serotypen, einer Kodon Optimierung des FIX Transgens und der Entwicklung von starken aber dennoch leberspezifischen Promotoren, erreicht. Hierdurch war es möglich mittels AAV Gentherapie in Hämophilie B Patienten bereits ein FIX Aktivitätsmaximum von 12% zu erreichen (132;150-154). Dieses Expressionsmaximum konnte zudem noch durch die Verwendung der sogenannten Padua Mutante des FIX Transgens gesteigert werden (69). Die Padua Mutation wurde erstmals 2009 von Simioni und Kollegen beobachtet und beschreibt genetisch die Substitution der Aminosäure Arginin gegen Leucin an Position 338, welches eine bis zu 8-fach gesteigerte FIX Aktivität trotz physiologischen Antignspiegeln im Plasma zur Folge hat (196). Trotz der



vielversprechenden Entwicklung der Gentherapie in Hinblick auf die erreichten FIX Aktivitäten sind neue, aus den präklinischen Studien in Tiermodellen nicht vorhersagbare Probleme aufgetreten. Hierzu zählt ein mit der AAV Gentherapie verbundener Anstieg an Transaminasen als Anzeichen einer Lebertoxizität. Als Ursache hierfür werden zurzeit zwei verschiedene Mechanismen diskutiert. Zum einen die Präsentation von Kapsid Strukturen über die MHC-I und MHC-II Komplexe und der damit einhergehenden Auslösung einer zytotoxischen T Zell Antwort gegen transduzierte Hepatozyten (84;135-138). Zum anderen eine Stressreaktion transduzierter Hepatozyten durch eine übermäßige Proteinexpression ausgelöst durch eine strikt perivaskulär limitierte Transduktion (132). Beide Mechanismen haben einen Zusammenhang mit der für die AAV Gentherapie verwendeten Vektordosis gemein. Daraus resultiert das momentane (Haupt)Bestreben die Vektordosis für die AAV Gentherapie weiter zu reduzieren ohne dabei den minimal notwendigen FIX Aktivitätsspiegel im Plasma zu verlieren. Aus diesem Grund wurden in diesem Labor zwei weitere hyperaktive FIX Mutanten generiert. Eine zusätzliche Aktivitätssteigerung um das 20-fache verglichen mit dem Wildtyp FIX Protein wurde durch den Austausch der Aminosäure Serin gegen Tryptophan an Position 377 erreicht (171) und fortan als FIX LW bezeichnet. Die FIX KLV Variante wurde durch den zusätzlichen Austausch der Aminosäure Valin gegen Lysin an Position 10 erweitert (30), die dadurch bedingte verminderte Kollagen Typ IV Bindungsaffinität konnte auch in dieser Arbeit mit einem Kollagen Typ IV Bindungs Assay bestätigt werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit erfolgte die Generierung der für Proteinproduktion im großen Maßstab benötigten Zelllinien durch lentivirale Transduktion der HEK293T Zelllinie mit der jeweiligen FIX Variante als Transgen gefolgt von der Charakterisierung sowie Expansion geeigneter Zellklone. Die in vitro Charakterisierung dieser Zellklone zeigte zwar eine reduzierte Expression der mutierten FIX Varianten, was allerdings weder durch Sekretionsanalysen noch durch Untersuchungen zum intrazellulären Transport mechanistisch erklärt werden konnte. Auch der mittels SDS-PAGE sichtbar gemachte Glykosylierungsstatus schien quantitativ zwischen den FIX Proteinen vergleichbar gewesen zu sein. Die Aufreinigung der für die in vivo Experimente benötigten rekombinanten FIX Proteine wurden ebenfalls in dieser Doktorarbeit etabliert und erfolgte mittels Anionen-Austausch-Chromatographie.

Funktionalitätsanalysen der rekombinanten FIX Proteine zeigten eine 5-fach gesteigerte Aktivität der Padua Variante gegenüber dem Wildtyp, wohingegen die FIX LW und FIX K LW Varianten eine zusätzliche Steigerung um das 7 bis 8-fache aufwiesen. Die Abwesenheit von durch die Aufreinigung verursachtem voraktiviertem FIXa konnte durch die Visualisierung der Proteine mittels Western Blot sowie die Anwendung eines chromogenen Assays gegen FIXa bewiesen werden.

Durch die Veränderung der Proteinsequenz und der damit verbundenen möglichen Entstehung von neuen Epitopen wurde im nächsten Teil der Arbeit das immunogene Potential der FIX Varianten in zwei experimentellen Ansätzen untersucht. Die intramuskuläre Injektion der FIX Proteinvarianten in Hämophilie B Mäusen führte immunologisch zu keiner Reaktion. Erst die Kombination der FIX Proteinvarianten mit dem inkompletten Freundschens Adjuvans und der zweimaligen subkutanen Injektion führte zu einem drastischen Anstieg der FIX IgG1 Konzentration in den Mausplasmen. Es konnte zwar tendenziell sogar ein geringerer Anstieg der FIX IgG1 Konzentration bei den drei hyperaktiven Varianten im Vergleich zum Wildtyp FIX beobachtet werden allerdings ohne statistische Signifikanz, so dass zum aktuellen Stand von keiner gesteigerten Immunogenität durch die Einzelnukleotidaustausche auszugehen ist.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die pharmakokinetische Charakterisierung der FIX Proteinvarianten. Durch subkutane oder intravenöse Injektion der aufgereinigten FIX Proteine und retroorbitale Blutentnahme zu definierten Zeitintervallen wurde sowohl die extravaskuläre Umverteilung als auch die Eliminierung der FIX Proteine aus dem Plasma von Hämophilie B Mäusen untersucht. Hierbei zeigte die K LW Variante aufgrund der verminderten Bindung an Kollagen TypIV und der damit verbundenen reduzierten extravaskulären Sequestrierung eine deutlich erhöhte Bioverfügbarkeit im Plasma sowohl nach subkutaner als auch intravenöser Injektion. Pharmakokinetische Analysen unter Annahme eines Zwei-Kompartimenten Systems zeigten hingegen eine deutlich gesteigerte Elimination der FIX K LW Variante aus dem Plasma, welches beispielsweise durch eine Halbwertszeit verlängerte Modifikation korrigiert werden könnte. Als letzten Teilaspekt in dieser Doktorarbeit wurden die neu generierten hyperaktiven FIX Varianten auf ihr Potential für ihren Einsatz in der Gentherapie hin untersucht. Die Überprüfung der Effizienz erfolgte unter Verwendung einer niedrigen

Dosisstufe mit  $5 \times 10^{10}$  vg/kg. Die errechnete spezifische Aktivität ergab eine 5-fach gesteigerte Aktivität der Padua Variante verglichen mit dem FIX Wildtyp. Die Verwendung der FIX LW und K LW Variante als Transgen resultierte sogar in einer 14-fach gesteigerten spezifischen Aktivität verglichen mit dem Wildtyp. Auffällig war auch in diesem Teilabschnitt die verminderte Proteinexpression der hyperaktiven FIX Proteinvarianten im Vergleich zum Wildtyp, dies konnte allerdings mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten mechanistisch nicht begründet werden. Die Verwendung einer hohen Dosisstufe mit  $2 \times 10^{11}$  vg/kg sollte Rückschlüsse auf eine mögliche erhöhte Thrombogenität ausgelöst durch die Hyperaktivität liefern. Dies konnte allerdings mit Bestimmung der Konzentration an D-Dimeren und Thrombin-Antithrombin-Komplexen in Plasmen gentherapierter Hämophilie B Mäuse als nicht relevant bestätigt werden. Es konnte auch keine erhöhte Immunogenität der FIX Varianten in gentherapierten Mäusen nachgewiesen werden, sodass die hyperaktiven Varianten LW und K LW diesbezüglich sicher zu sein scheinen und in der AAV Gentherapie getestet werden können. Des Weiteren ist der Einsatz der FIX K LW Variante für die Etablierung einer subkutan zu applizierenden Substitutionstherapie denkbar, vergleichend mit dem zurzeit in klinischen Studien getesteten Dalcinonacog alpha (NCT03995784).

## Abstract

Hemophilia is an X-linked inherited blood coagulation disorder and can be classified as hemophilia A or hemophilia B, respectively, due to the lack of coagulation factor VIII or FIX (129). The classification into severe, moderate and mild affects both clinical manifestation and long-term prognosis for patients (214). In the severe form of haemophilia in particular, prophylactic substitution of patients with the respective missing coagulation factor is aimed at keeping the threshold value of the coagulation factor levels in the plasma above 1% at all times and thus preventing the occurrence of spontaneous bleeding in muscles and joints as far as possible (57;199). Due to the short half-life of maximum 24 hours for FIX, patients have to undergo this substitution procedure two to three times a week, which not only results in a loss of quality of life, but also poses a health risk (117;124). Therefore, the development of a gene therapy for the treatment of hemophilia has been progressively advanced in recent years. In this respect, hemophilia offers two advantages: on the one hand, it is a monogenetic defect and, on the other hand, minor corrections to the coagulation factor activities already have an enormous influence on the clinical prognosis for patients. The original goal of keeping the threshold of coagulation factor activity above 1% has already been achieved through various optimization processes, such as the use of self-complementary and liver-specific AAV serotypes, a codon optimization of the FIX transgene and the development of strong but nevertheless liver-specific promoters. By this it was possible to achieve a FIX activity maximum of 12% in hemophilia B patients using AAV gene therapy (132;150-154). This expression maximum could also be increased by using the so-called Padua mutant of the FIX transgene (69). The Padua mutation was first observed by Simioni and colleagues in 2009 and genetically describes the substitution of the amino acid arginine for leucine at position 338, which results in an up to 8-fold increase in FIX activity despite physiological antigen levels in the plasma (196). Despite the promising development of gene therapy with regard to the achieved FIX activities, new problems have arisen that could not be predicted from preclinical studies in animal models. These include an increase in transaminases associated with AAV gene therapy as an indication of liver toxicity. Two different mechanisms are currently being discussed as the cause of this. One is the presentation of capsid structures via the MHC-

I and MHC-II complexes and the associated triggering of a cytotoxic T cell response against transduced hepatocytes (84;135;137;138). On the other hand, a stress response of transduced hepatocytes by excessive protein expression triggered by a strictly perivascularly limited transduction (132). Both mechanisms have in common a relationship with the vector dose used for AAV gene therapy. As a result, in the current (main) aim is to further reduce the vector dose for AAV gene therapy without losing the minimum necessary FIX activity level in the plasma. For this reason, two additional hyperactive FIX mutants were generated in this laboratory. An additional 20-fold increase in activity compared to the wild-type FIX was achieved by replacing the amino acid serine with tryptophan at position 377 (171) and henceforth called FIX LW. The FIX K LW variant was extended by the additional exchange of the amino acid valine for lysine at position 10 (30), the resulting reduced collagen type IV binding affinity could also be confirmed in this work with a collagen type IV binding assay.

In the first part of this work, the generation of the cell lines required for large-scale protein production was performed by lentiviral transduction of the HEK293T cell line with the respective FIX variant as transgene followed by the characterization and expansion of suitable cell clones. The in vitro characterization of these cell clones showed a reduced expression of the mutated FIX variants, but this could not be mechanistically explained either by secretion analyzes or by studies on intracellular transport. Also the glycosylation status visualized by SDS-PAGE seemed to be quantitatively comparable between the FIX proteins. The purification of the recombinant FIX proteins required for the in vivo experiments was also established in this PhD thesis and was performed by anion exchange chromatography. Functionality analyses of the recombinant FIX proteins showed a 5-fold increase in activity of the Padua variant compared to the wild type, whereas the FIX LW and FIX K LW variants showed an additional 7- to 8-fold increase. The absence of preactivated FIXa caused by purification was demonstrated by visualizing the proteins by Western Blot and the application of a chromogenic assay against FIXa.

Due to the changes of protein sequence and the associated possible formation of new epitopes, the immunogenic potential of the FIX variants was investigated in the next part of this PhD thesis in two experimental approaches. The intramuscular injection of

the FIX protein variants into hemophilia B mice did not lead to an immunological reaction. Only the combination of the FIX protein variants with the incomplete Freund's adjuvant and two subcutaneous injections led to a drastic increase in the FIX IgG1 concentration in the mouse plasmas. A slight increase in the FIX IgG1 concentration was observed in the three hyperactive variants compared to the wild-type FIX, but without statistical significance, so that at the current level, no increased immunogenicity can be assumed from the individual nucleotide exchanges.

Another aspect of this work was the pharmacokinetic characterization of the FIX protein variants. By subcutaneous or intravenous injection of the purified FIX proteins and retroorbital blood sampling at defined time intervals, both extravascular redistribution and elimination of the FIX proteins from the plasma of hemophilia B mice were investigated. Due to the reduced binding to type IV collagen and the associated reduced extravascular sequestration, the KLW variant showed a significantly increased bioavailability in plasma both after subcutaneous and intravenous injection. Pharmacokinetic analyzes using a two-compartment system showed a significantly increased elimination of the FIX KLW variant from the plasma, which could be corrected by e.g. a half-life extended modification.

As a final partial aspect in this thesis the newly generated hyperactive variants were examined for their potential for the use in AAV gene therapy. The efficiency was tested using a low dose level of  $5 \times 10^{10}$  vg/kg. The calculated specific activity resulted in a 5-fold increase in activity of the Padua variant compared to the wild type FIX. The use of the FIX LW and KLW variant as transgene even resulted in a 14-fold increase in specific activity compared to the wild type. The reduced protein expression of the hyperactive FIX protein variants compared to the wild type was also noticeable in this sub-section but this could not be mechanistically justified with the data collected in this study. The use of a high dose level of  $2 \times 10^{11}$  vg/kg should provide conclusions on a possible increased thrombogenicity caused by hyperactivity. However, this could be confirmed as irrelevant by determining the concentration of D-dimers and thrombin-Antithrombin complexes in plasmas of genetically treated hemophilia B mice. No increased immunogenicity of the FIX variants in gene-treated mice could be detected, so that the hyperactive variants LW and KLW seems to be and can be evaluated in

human AAV gene therapy. Furthermore, the use of the FIX KLV variant for the establishment of a subcutaneous substitution therapy is conceivable, compared to the Dalcinonacog alpha (NCT03995784) currently being tested in clinical trials.

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämophilie

Bei der Hämophilie handelt es sich um eine X-chromosomal rezessiv vererbte Blutgerinnungsstörung, die daher überwiegend männliche Nachkommen betrifft. Anhand der zugrunde liegenden Mutation im Gerinnungsfaktor VIII (FVIII) oder Gerinnungsfaktor IX (FIX) Gen wird zwischen der Hämophilie A oder der Hämophilie B unterschieden. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation sind heutzutage weltweit circa 400.000 Menschen von dieser Erkrankung betroffen, wobei die Hämophilie A mit einer Inzidenz von 1 in 5000 Individuen deutlich häufiger auftritt als die Hämophilie B mit einer Inzidenz von 1 in 30000 männlichen Neugeborenen (129).

### 1.1.1 Klinische Manifestation

Das Krankheitsbild beider Formen der Hämophilie ist nahezu identisch. Bis vor kurzem wurde ein deutlich milderer Krankheitsverlauf bei Patienten mit einer Hämophilie B diskutiert. Diese Hypothese konnte allerdings mit einer kürzlich durchgeführten Studie widerlegt werden, in der zum einen die Blutungsfrequenz, das Gewebe in denen spontane Blutungen auftreten, sowie die Einschätzung der Patienten hinsichtlich ihrer Lebensqualität hin untersucht wurden (17). Das Auftreten von spontanen Blutungen ist hierbei zum einen vom Schweregrad der Erkrankung abhängig, korreliert allerdings auch mit dem zunehmenden Alter der Patienten. Zur Klassifizierung der Hämophilie Schweregrade spielen die verbleibenden Gerinnungsfaktor Aktivitäten eine entscheidende Rolle (siehe Tabelle 1.1). Die Verlaufsform der Hämophilie lässt sich in die drei Schweregrade schwer, moderat und mild einteilen, deren Restaktivitäten bei <1%, 1-5% respektive 5-40% liegen (214).



**Tabelle 1.1:** Unterteilung der Schweregrade der Hämophilie anhand verbleibender Gerinnungsfaktor Aktivitäten. Modifiziert nach (199).

Schweregrad	Faktoraktivität
Schwer	< 1%
Moderat	1-5%
Mild	5-40%

Die Diagnose der Hämophilie erfolgt in 70% aller Fälle aufgrund einer familiär bekannten Vorerkrankung und kann bei der Hämophilie A direkt nach der Geburt durch die Ermittlung der FVIII Aktivität im Nabelschnurblut erfolgen (7). Bei der Hämophilie B hingegen muss nach 6 Monaten eine zusätzliche Bestimmung der FIX Aktivität erfolgen, da der Gerinnungsfaktor IX, wie alle Vitamin K abhängigen Faktoren, zum Zeitpunkt der Geburt reduziert vorliegt und somit der, direkt nach der Geburt bestimmte, Schweregrad falsch diagnostiziert sein könnte (8). Neben der Gerinnungsdiagnostik wird zudem eine genetische Analyse der zugrunde liegenden Mutation empfohlen, da diese Hinweise auf eine spätere Antikörperentwicklung gegen den infundierten Gerinnungsfaktor geben kann. Hierbei weisen große Deletionen sowie *Nonsense* Mutationen ein höheres Risiko zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern auf als *Missense* und *Splicing* Mutationen (73). In Hämophilie B Patienten sind 70% aller Mutationen *Missense*, *Nonsense* oder *Splicing* Mutationen. Aufgrund dessen ist die Inzidenz der Antikörper Bildung in Hämophilie B Patienten auch weitaus geringer im Vergleich zu Hämophilie A Patienten, bei der das Vorhandensein von sogenanntem kreuzreagierendem Material (*cross reacting material- CRM*) zu einer Toleranzinduktion führt (119). Patienten mit einer schweren Verlaufsform der Hämophilie erleiden spontane Blutungen in Muskeln sowie in die Gelenke. Hämatome sind hierbei bereits bei Kleinkindern im Alter von 6-8 Monaten zu beobachten, sobald die Mobilität zunimmt (205). Das Risiko, spontan in die Gelenke zu bluten, nimmt zudem mit dem Alter drastisch zu. Zu den am meisten betroffenen Gelenken zählen die Knöchel, die Ellbogen und die Knie (55;200). Die daraus resultierende hämophile Arthropathie bedeutet einen enormen Verlust an Lebensqualität für die betroffenen Patienten. Bedingt wird die Arthropathie durch eine chronische Synovitis, ausgelöst durch Hämosiderin Ablagerungen und die Apoptose von Knorpelzellen durch die Eisen vermittelte Bildung von Sauerstoffradikalen (177). Zudem bewirkt Eisen eine Überexpression von pro-

inflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise IL-6, IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$ . Des Weiteren initiiert Eisen das synoviale Pannuswachstum durch eine Dysregulation der Gene *c-myc* und *mdm2* (130). Bei Patienten mit einer moderaten Hämophilie erfolgt die Diagnose meist zu einem späteren Zeitpunkt nach Traumata oder Operationen. Spontane Blutungen, wie sie in Patienten mit einer schweren Hämophilie beobachtet werden, sind nur bei etwa 25% der Patienten zu beobachten. Eine milde Hämophilie ist nicht mehr mit dem Auftreten von spontanen Blutungen assoziiert und wird zudem erst durch eine präoperative Gerinnungsdiagnostik festgestellt (44;161).

### 1.1.2 Substitutionstherapie

Die Behandlung der Hämophilie wurde bereits im 19ten Jahrhundert mittels direkter Bluttransfusion durchgeführt. Erst Mitte des 20ten Jahrhunderts wurde die Behandlung mittels Vollblut durch gefrorenes Plasma ersetzt. 1965 erfolgte schließlich die Entdeckung der Gerinnungsfaktoren im Plasma durch Judith Pool gefolgt von der Entwicklung zur Herstellung dieser Faktoren im großen Maßstab (166;212). In den 70er und 80er Jahren hingegen erlebte die Behandlung der Hämophilie einen herben Rückschlag. Viele Patienten wurden zu dieser Zeit durch kontaminierte Blutprodukte mit HIV und Hepatitis C infiziert. Aufgrund komplexer Pathogeninaktivierungsverfahren ist das Risiko sich an kontaminierten Blutprodukten zu infizieren auf das Minimalste reduziert. Ende des 20ten Jahrhunderts waren dann die ersten kommerziellen rekombinant hergestellten Gerinnungsfaktor Konzentrate erhältlich (128). Die moderne Behandlung der Hämophilie beruht weiterhin auf der Substitutionstherapie, bei der der fehlende Gerinnungsfaktor den Patienten infundiert wird. Hierbei kann die Substitutionstherapie nach Bedarf, sprich bei Auftreten von Blutungen, oder prophylaktisch erfolgen und richtet sich nach dem jeweiligen Schweregrad der Erkrankung (199). Die prophylaktische Substitutionstherapie wird vorwiegend bei Patienten mit einer schweren Verlaufsform der Hämophilie angewendet und verfolgt das Ziel, die Gerinnungsfaktor Spiegel im Plasma stets über dem Schwellenwert von 1% zu halten um somit das Auftreten von spontanen Blutungen drastisch zu reduzieren (58). Wegen der geringen Halbwertszeit von 18-24 Stunden für FIX und sogar nur 8-12 Stunden für FVIII müssen sich die Patienten zwei bis dreimal wöchentlich der Behandlung unterziehen, wobei 25-40 IU/kg Körpergewicht

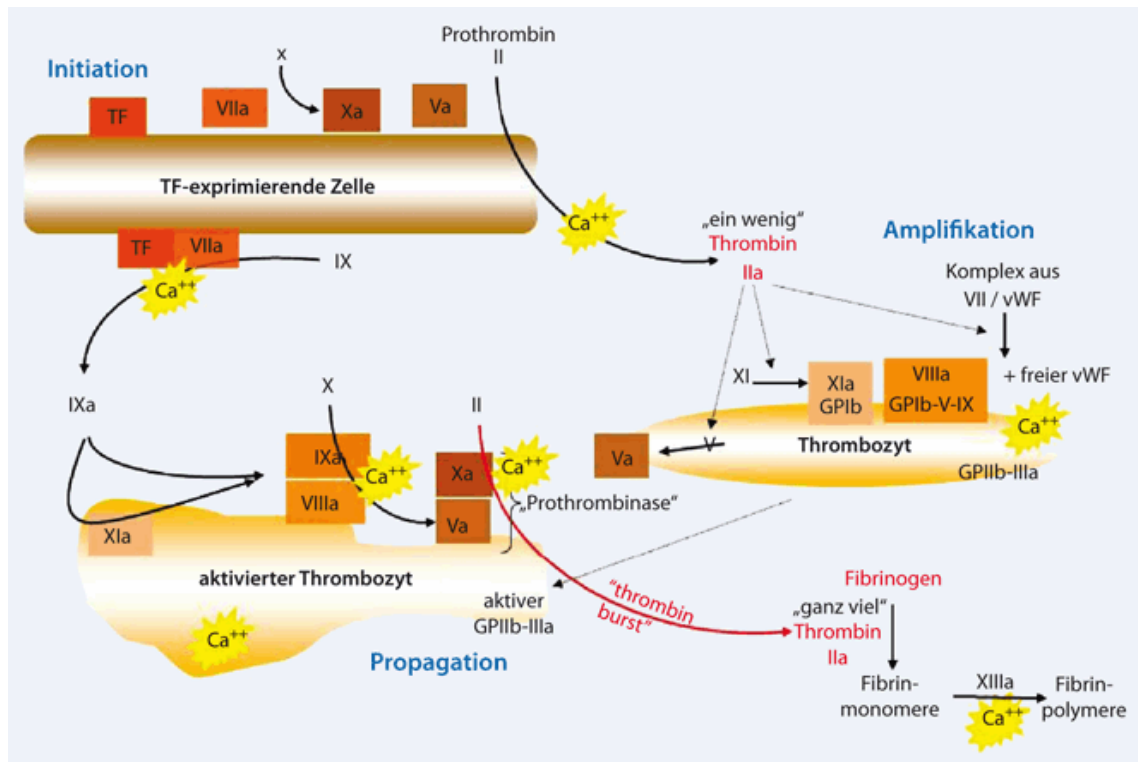
Faktorkonzentrat infundiert werden (117). Zudem muss mit der Prophylaxe so früh wie möglich begonnen werden, um einer chronischen Schädigung der Gelenke vorzubeugen. Daher wird vermehrt ein zentraler Venenkatheter verwendet, um auch eine Infusion zu Hause für die Eltern praktikabel zu machen. Dieser Zugang stellt allerdings ein Gesundheitsrisiko hinsichtlich von Infektionen und der Entstehung von Thrombosen dar (124). Neben den Komplikationen der mehrfach wöchentlich zu erfolgenden Infusionen besteht zudem das Risiko der Entwicklung von sogenannten Inhibitoren gegen die infundierten Gerinnungsfaktor Konzentrate (109;142). Inhibitoren sind zumeist polyklonale Immunglobulin G (IgG) Antikörper mit einer hohen Affinität zum jeweiligen Gerinnungsfaktor, die dessen Aktivität inhibieren. Der Nijmegen-Bethesda Assay dient der Quantifizierung von inhibitorischen Antikörpern, wobei Inhibitoren mit einem Wert von fünf Bethesda Units oder mehr als hochtitrige Antikörper gewertet werden. Patienten mit ebensolchen hochtitrigen Antikörpern können letztendlich bei auftretenden Blutungen nur noch mit sogenannten *Bypassing* Produkten behandelt werden (79;102;113;118). Die Entwicklung von Inhibitoren ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Hierzu zählen sowohl die zugrunde liegende Genmutation (134), Polymorphismen in regulatorischen Genen des Immunsystems (5) als auch der Ursprung des Gerinnungsfaktorpräparates (33;56). Bei der schweren Form der Hämophilie A entwickeln 30% der Patienten 20-30 Tage nach der ersten Behandlung Inhibitoren, wohingegen die Inzidenz der Inhibitor Entwicklung bei der schweren Form der Hämophilie B nur bei 4-5% liegt (41).

## 1.2 Gerinnungsfaktor IX (FIX)

### 1.2.1 Die Gerinnungskaskade

Ursprünglich wurde angenommen, dass alleine der Kontakt von Blut mit der Luft ausreichend ist, um die Blutgerinnung zu initiieren. Anfang des 20ten Jahrhunderts erfolgte die Entdeckung, dass Fibrinogen durch Thrombin zu Fibrin gespalten wird, welches letztendlich polymerisiert und ein stabiles Fibrin Netzwerk ausbildet. Die weiteren Enzyme der Gerinnungskaskade wurden ab Mitte des 20ten Jahrhunderts beschrieben und nach ihrem Zeitpunkt der Entdeckung nummeriert (86). Das Modell

der Gerinnungskaskade beschreibt die serielle Spaltung und Aktivierung von Zymogenen und wird in einen Gewebefaktor (*Tissue factor*, TF) abhängigen extrinsischen und einen Kontakt vermittelten intrinsischen Weg unterteilt. Beide Wege vereinigen sich in der Aktivierung von Faktor X, welcher die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin katalysiert (35). Für die *in vitro* Diagnostik von Gerinnungsdefekten ist dieses Kaskadenmodell mehr als ausreichend, so lassen sich Defekte im extrinsischen Weg mittels verlängerter Prothrombin Zeit identifizieren, wohingegen Defekte im intrinsischen Weg durch eine verlängerte aktivierte partielle Thromboplastin Zeit (aPTT) angezeigt werden (125). Dennoch spiegelt dieses Kaskadenmodell bei weitem nicht die Komplexität *in vivo* wieder. So zeigt sich beispielsweise in Hämophilie Patienten mit einem Defekt in den Gerinnungsfaktoren IX oder VIII ein starker Blutungsphänotyp obwohl der extrinsische Weg bestehend aus Gewebefaktor und FVII vollkommen intakt ist und somit den intrinsischen Weg kompensieren sollte (63). Aufgrund dessen wurde schließlich das sogenannte Zell-basierte Modell der Gerinnung entwickelt, welches die Gerinnung in dem dynamischen Umfeld des vaskulären Systems beschreibt und zwei verschiedene Zelltypen, Thrombozyten sowie TF-exprimierende Zellen, mit einbezieht (siehe Abbildung 1.1). Die TF-exprimierenden Zellen sind hierbei außerhalb des Gefäßsystems anzutreffen, wodurch eine Exposition mit den Blutkomponenten erst nach Verletzungen ermöglicht wird. Als einziges Enzym der gesamten Gerinnungskaskade zirkuliert FVII bereits in seiner aktivierten (FVIIa) Form und kann daher direkt an den exponierten TF binden. Der gebildete TF-FVIIa Komplex aktiviert zum einen in einer positiven Rückkopplungsschleife FVII und des Weiteren geringe Mengen an FIX und FX. Im weiteren Verlauf kann FXa seinen eigenen Kofaktor, Faktor V, aktivieren und zusammen als sogenannter Prothrombinase Komplex die ersten geringen Mengen an Thrombin durch Spaltung von Prothrombin generieren. Der oben beschriebene Mechanismus wird auch als Initiations-Phase der Gerinnung bezeichnet und findet ausschließlich an der Membran von TF-exprimierenden Zellen statt (143-145).



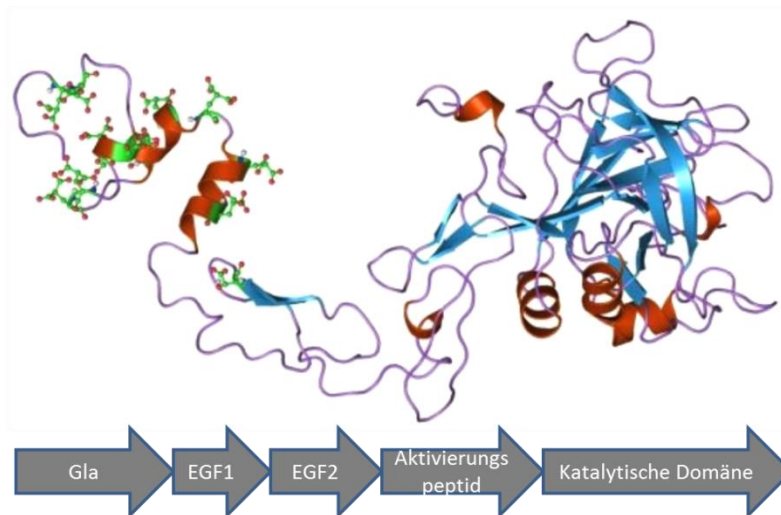
**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des Zell-basierten Gerinnungsmodells. Lier, H., Krep, H. & Schöchl, H. Anaesthesist (2009) 58: 1010.

Das während der Initiationsphase entstandene Thrombin dissoziiert von der Membran der TF-exprimierenden Zellen und übernimmt eine Schlüsselrolle im weiteren Verlauf der Gerinnung, der Amplifikations-Phase. Thrombin bindet zum einen an G Protein gekoppelte Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) die sich auf der Membran von Thrombozyten befinden (36;37). Aufgrund dessen wird in den Thrombozyten eine Vielzahl von Signalkaskaden in Gang gesetzt, welche die Thrombozyten in einen aktivierten und gerinnungsfördernden Zustand versetzen. Dies erfolgt unter anderem durch Veränderungen der Zellmorphologie vermittelt über den Rho Signalweg (103). Ein weiterer Signalweg führt über die Aktivierung von Phospholipase C $\beta$  und endet in der Mobilisierung von Kalzium, der Aktivierung von Integrinen und der Freisetzung von Granula mit gerinnungsfördernden Substanzen (157). Eine Erhöhung der Kalziumkonzentration im Zytosol fördert zudem die Aktivität des Enzyms Scramblase (206). Im ruhenden Zustand weist eine Zelle eine asymmetrische Phospholipid Komposition zwischen der nach innen und der nach außen gerichteten Seite auf. Neutrale Phospholipide wie Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Sphingolipide befinden sich hierbei überwiegend auf der nach außen gerichteten Seite, wohingegen

negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin an der Innenseite der Lipidschicht anzutreffen sind (11). Das Enzym Scramblase bewirkt letztendlich die Umverteilung der Phospholipide und eine Anreicherung von Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin an der Außenseite der Lipidmembran, wodurch die Bindung von Gerinnungsfaktoren an die Membran von Thrombozyten begünstigt wird (206). Zum anderen aktiviert Thrombin die beiden Gerinnungsfaktoren IX und FV und spaltet den von Willebrand Faktor von FVIII. Die Propagierungs-Phase stellt schließlich den finalen Schritt der Gerinnung dar und wird durch die Zusammenlagerung des Tenase-Komplexes, bestehend aus aktivierten FIXa, dem Kofaktor FVIIIa und FX auf der Membran von aktivierten Plättchen eingeleitet. Durch die Aktivität des Tenase-Komplexes kommt es zu einem rapiden Anstieg der Generierung an aktiviertem FXa, welcher zusammen mit seinem Kofaktor als Prothrombinase Komplex die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin potenziert. Dieser Überschuss an Thrombin generiert eine erhebliche Menge an Fibrin aus Fibrinogen, und sobald eine kritische Masse an freien Fibrin Molekülen erreicht ist, polymerisieren diese spontan und bilden ein stabiles Fibrinnetzwerk aus, wodurch es letztendlich zum Verschluss der Wunde kommt (86).

### 1.2.2 FIX-Struktur

Das Gen von FIX befindet sich auf dem langen Arm des X-Chromosoms mit einer Spannbreite von 33,5 Kilobasen und 8 Exonen (223). FIX wird in der Leber von Hepatozyten als Vorläuferprotein bestehend aus 461 Aminosäuren synthetisiert und nach Abspaltung des 46 Aminosäuren langen Signalpeptids als 415 Aminosäuren langes Zymogen in die Blutzirkulation sezerniert. Während der Biosynthese erlangt das Protein eine Reihe an posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung, Hydroxylierung, Sulfatierung, Phosphatierung und  $\gamma$ -Carboxylierung (78;225). Die Notwendigkeit der posttranslationalen  $\gamma$ -Carboxylierung macht die Biosynthese des reifen Gerinnungsfaktor IX Vitamin K abhängig. Allen  $\gamma$ -carboxylierten Gerinnungsfaktoren gemein ist eine homologe Anordnung der Domänen bestehend aus einer N-terminalen Gla Domäne, gefolgt von meist zwei *epidermal growth factor* (EGF) like Domänen, einem Aktivierungspeptid und einer C-terminal gelegenen katalytischen Domäne (225) (siehe Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2:** FIX Struktur. N-terminal befindet sich die  $\gamma$ -carboxylierte Gla Domäne, gefolgt von zwei Epidermal growth factor like (EGF) Domänen. C-terminal ist eine katalytische Domäne, welche zu den S1 Typ Serin Proteasen gezählt wird. Dazwischen liegt zudem noch das Aktivierungspeptid, welches in Folge der Aktivierung durch den TF-FVIIa Komplex oder Thrombin abgespalten wird. Modifiziert nach (18).

### 1.2.2.1 Die Gla Domäne

Die Gla Domäne ist mit wenigen Ausnahmen überwiegend in Gerinnungsfaktoren anzutreffen und der Name ergibt sich aus der Carboxylierung der  $\gamma$ -Kohlenstoffe in Glutaminsäure Resten. Die Carboxylase selber ist ein integrales Membranprotein im Endoplasmatischen Retikulum und katalysiert die Umwandlung der reduzierten Form des Vitamin K zu einem Dialkoxid. Diese Form ermöglicht die Aufnahme eines Protons des  $\gamma$ -Kohlenstoffes, an dessen Stelle dann ein Kohlendioxidmolekül gebunden wird (168). Der daraus resultierende Überschuss an negativer Ladung ermöglicht die Komplexierung von Kalzium Ionen. Durch die Neutralisierung der negativen Ladungen und folglich die Aufhebung der elektrostatischen Abstoßung erfolgt eine strukturelle Veränderung innerhalb der Gla Domäne, wodurch überwiegend hydrophobe Aminosäure Reste nach außen exponiert werden (18;197). Diese Neuordnung und Exposition von hydrophoben Resten ermöglicht letztendlich die Bindung von FIX an Lipidmembranen. Neben der Membran-verankernden Funktion ist die Gla Domäne zudem an der Kofaktor FVIII Bindung beteiligt. Experimente mittels Antikörper-vermittelter Inhibierung lokalisierten die C2 Domäne von FVIII als Bindungsstelle der Gla Domäne (15).

### 1.2.2.2 *Epidermal Growth Factor like (EGF) Domäne*

Die auf die Gla Domäne folgenden beiden EGF *like* Domänen sind strukturell durch die Bildung von Disulphidbrücken zwischen den Cystein Resten charakterisiert, welche der

kurzen Sequenz eine gewisse Stabilität verleihen. Im Gerinnungsfaktor IX ist eine Funktion der EGF *like* Domänen die räumliche Trennung zwischen der Membran-verankerten Gla Domäne und der C-terminalen katalytischen Domäne. Mutationen innerhalb der N-terminalen EGF *like* Domäne zeigten zudem deren Beteiligung an der Bindung des Kofaktors FVIII (173).

### 1.2.2.3 Das Aktivierungspeptid

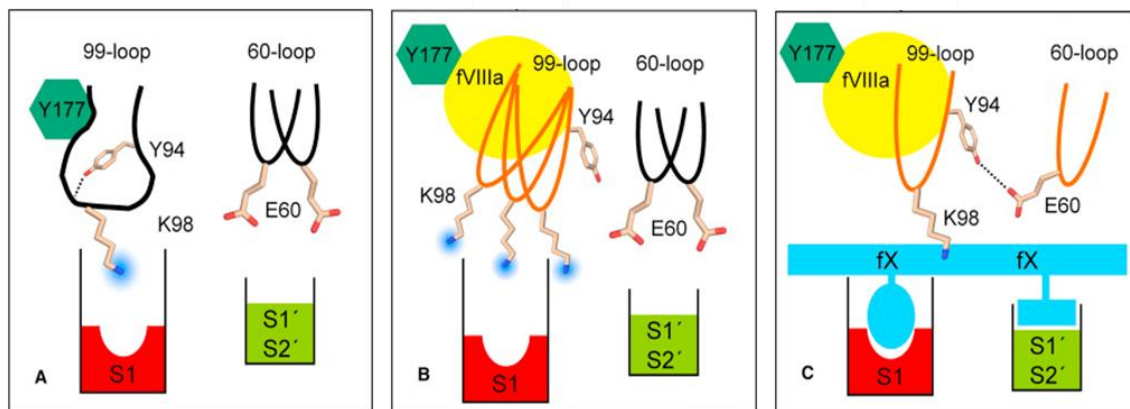
Die Sequenz des Aktivierungspeptids verschiedener Gerinnungsfaktoren ist nur sehr gering konserviert und variiert zudem sehr stark in der Anzahl der Aminosäuren. Hierbei trägt die Länge des jeweiligen Aktivierungspeptids maßgeblich zur Halbwertszeit im Plasma bei. FX mit einer Halbwertszeit von circa 40 Stunden weist hierbei das längste Aktivierungspeptid auf, wohingegen FVII ohne diese Domäne nur eine Halbwertszeit von fünf Stunden besitzt (85;158;176). Belegt wird diese Korrelation beispielsweise durch die Insertion des Aktivierungspeptids von FX in FVII und die damit erzielte 4-fach verlängerte Halbwertszeit (95). FIX weist mit einem aus 35 Aminosäuren bestehendem Aktivierungspeptid eine intermediäre Halbwertszeit von 18-24 Stunden auf (85). Zudem finden am Aktivierungspeptid eine Vielzahl an posttranslationalen Modifikationen statt. So ist beispielsweise das Aktivierungspeptid von FIX reich an den beiden Aminosäuren Glutamat und Aspartat. Das massive Vorhandensein von N- und O-verknüpften Glykosylierungen erhöht zum einen die Löslichkeit des Zymogens, zum anderen verhindert es die vorzeitige Spaltung und somit vorzeitige Aktivierung des FIX (123). Zur Aktivierung finden zwei serielle proteolytische Spaltungen, katalysiert durch FXIa oder den FVIIa/TF Komplex, an den Position Arg145/Ala146 und Arg180/Val181 statt. Die daraus resultierende Freisetzung des Aktivierungspeptids und die Unterteilung des FIX in eine leichte und eine schwere Kette komplettiert dessen Aktivierung (189).

### 1.2.2.4 Die katalytische Domäne

Die katalytische Domäne des FIX zählt zu den S1 Typ Serinproteasen und weist daher die typische Anordnung der Aminosäuren His221(57)/Asp269(102)/Ser365(195) in der katalytischen Triade auf (188). Strukturell setzt sich die Domäne aus zwei  $\beta$ -Fässern zusammen (209), deren sterische Anordnung in der Ausbildung der katalytischen Triade



resultiert. Durch die ko-evolutionäre Entstehung der beiden  $\beta$ -Fässer besitzt jedes Fass zudem nahe der C-terminalen Helix eine Heparin bindende *Exosite* (221), eine hoch affine Bindestelle für Kalzium-Ionen (88), sowie eine Bindestelle für Natrium Ionen (225). Innerhalb des jeweiligen  $\beta$ -Fasses sowie zwischen den beiden Fässern sorgen Disulphidbrücken für die strukturelle Stabilität und insbesondere für den Zusammenhalt der schweren und leichten Kette nach Abspaltung des Aktivierungspeptids (225). Durch die proteolytische Spaltung des Aktivierungspeptids befindet sich nun N-terminal die positiv geladene Aminosäure Valin, welche sich mehr als 20 Angström hin zur negativ geladenen Asparaginsäure an Position 194 bewegt. Die daraus resultierende drastische Konformationsänderung führt letztendlich zur Ausbildung der primären Substrattasche S1 (88). Die katalytische Aktivität von FIXa an sich ist relativ gering; erst in Kombination mit dem Kofaktor FVIIIa findet eine Potenzierung der Aktivität um das  $10^6$ -fache statt (195). Ursache ist der sogenannte 99 Loop, welcher aufgrund seiner Flexibilität in die Substrattasche S1 und S2 hineinragt (188). Zusätzlich befindet sich an Position 98 die positiv geladene Aminosäure Lysin, welche zudem eine elektrostatische Abstoßung von den überwiegend vorhandenen basischen Aminosäuren an Position P1 in den entsprechenden Substraten bewirkt. Alleine die Substitution an ebendieser Position gegen eine ungeladene Aminosäure erhöht die katalytische Aktivität bereits um das 8-fache (87). Zudem wird der Zugang des Substrates FX durch die Ausbildung einer Wasserstoff-Brücke zwischen dem Lysin an Position 98 und dem Tyrosin an Position 94 sterisch blockiert (88;225). Erst durch die vorausgehende Interaktion mit dem Kofaktor FVIIIa findet eine Umlagerung des 99 Loop statt, so dass die Substrattasche für FX zugänglich wird (226) und sich die potenzierte katalytische Aktivität des Tenase Komplexes entfalten kann (siehe Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3:** Konformationsänderungen innerhalb von FIX durch serielle Kofaktor FVIIIa und Substrat FX Bindung. (A) In Abwesenheit von FVIIIa sowie FX wird sowohl die Substrattasche S1, als auch S2 sterisch und elektrostatisch durch die beiden Loopstrukturen 99 Loop und 60 Loop blockiert. (B) Durch die Bindung des Kofaktors FVIIIa findet zunächst eine sterische Umlagerung des 99 Loops statt, (C) wodurch nachfolgend FX an die Substrattaschen binden kann. Aus diesem Grund potenziert die Ausbildung des Tenase Komplexes die Aktivität von FIXa um das  $10^6$ -fache. Modifiziert nach (226).

### 1.2.3 Interaktion von FIX mit Kollagen Typ IV

Die Interaktion zwischen Gerinnungsfaktor IX und Endothelzellen wurde erstmals 1983 durch Heimark und Schwartz beschrieben. Unter Verwendung von radioaktiv gelabeltem FIX konnte eine hoch affine Bindung an Endothelzellen nachgewiesen werden, welche zudem Kalzium abhängig war. Auch wurde hier erstmals ein Zusammenhang zwischen dem rapiden Verlust von infundiertem FIX aus der Zirkulation und der Bindung an Endothelzellen hergestellt, welcher nach wie vor von klinischer Relevanz ist (81). Erst neun Jahre später wurde die für die Bindung verantwortliche Region im FIX identifiziert. Experimente mit chimären Proteinen zeigten schließlich, dass die ersten 11 Aminosäuren innerhalb der Gla Domäne für die Bindung an Endothelzellen verantwortlich sind. Zur weiteren Identifikation von besonders relevanten Aminosäuren wurden Punktmutationen analysiert. Hierbei zeigte sich, dass ein Austausch der Aminosäure Lysin zu Alanin an Position 5 zu einer deutlich verringerten Bindung führt, wohingegen der Austausch zu Arginin in einer 3-fach gesteigerten Bindung an Endothelzellen resultiert. Ein zusätzlicher Verlust der Bindung an Endothelzellen konnte zudem durch den Austausch der Aminosäure Valin zu Lysin an Position 10 erreicht werden (30). Vier Jahre später erfolgte schließlich die Entdeckung, dass es sich bei dem extrazellulären Bindungspartner von FIX auf Endothelzellen um das extrazelluläre Matrix Molekül Kollagen Typ IV handelt (31).

Kollagen Typ IV ist ein Mitglied einer 28 verschiedener Typen umfassenden Proteinfamilie (174;175;226). Als Besonderheit ist Kollagen Typ IV ausschließlich in Basalmembranen anzutreffen. Das Protein setzt sich aus sechs genetisch distinkten  $\alpha$ -Ketten zusammen. Trotz der sich daraus ergebenden Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten werden ausschließlich 3 Heterotrimere gebildet:  $\alpha1 \alpha1 \alpha2$ ,  $\alpha3 \alpha4 \alpha5$  und  $\alpha5 \alpha5 \alpha6$ . Das erste genannte Heterotrimer wird auch als das klassische Heterotrimer bezeichnet und ist in allen Basalmembranen anzutreffen, wohingegen die letzten beiden Formen einer gewebe- und entwicklungsspezifischen Regulation unterliegen (90). Jede  $\alpha$ -Kette setzt sich aus einer Cystein und Lysin reichen N-terminalen Domäne, einer circa 1400 Aminosäuren langen Kollagen Domäne und einer C-terminalen Domäne zusammen (91). Der tatsächliche Beweis einer Interaktion zwischen FIX und Kollagen erfolgte im Jahr 1996 durch Wolberg und Kollegen. Unter Zuhilfenahme der Rasterkraftelektronenmikroskopie konnte nicht nur die Bindung direkt nachgewiesen werden, vielmehr konnten zwei spezifische Bindungsstellen in der Kollagen Domäne circa 98 nm und 50 nm entfernt vom C-Terminus identifiziert werden (217). Der physiologische Grund der Bindung von FIX an Kollagen Typ IV bleibt weiterhin ungeklärt. Erste Versuche zur physiologischen Bedeutsamkeit wurden 2002 von Gui und seinen Kollegen durchgeführt. Hierzu wurde die Pharmakokinetik der beiden bekannten Gl $\alpha$  Domänen Varianten K5A und K5R im Vergleich zum FIX WT erstmals *in vivo* in Hämophilie B Mäusen untersucht. Ausgehend von der Annahme eines Zwei Kompartimenten Modells der Pharmakokinetik zeigte die K5A Variante eine erhöhte Bioverfügbarkeit im Plasma unmittelbar nach der intravenösen Injektion als die beiden Kollagen Typ IV bindenden Varianten K5R und WT FIX. Während der darauffolgenden Eliminationsphase zeigte sich allerdings auch eine schnellere *Clearance* der nicht an Kollagen Typ IV bindenden Variante K5A (76). Von derselben Arbeitsgruppe erschien Jahre später eine weitere Veröffentlichung zu ebendieser vermindert an Kollagen Typ IV bindenden Variante. Ein generierter FIX K5A exprimierender Mausstamm wurde sowohl pharmakokinetisch als auch gerinnungsdiagnostisch charakterisiert. Überraschenderweise zeigte die K5A Variante eine erhöhte Blutungsneigung verglichen mit dem WT trotz vergleichbarer gemessener Aktivitäten im Plasma. Dies könnte ein Indiz für eine Bedeutung von extravaskulärem FIX für die Hämostase sein (77).

### 1.2.4 FIX Padua

Die Aminosäure Arginin liegt an Position 338 im FIX Gen in allen Säugetieren hoch konserviert vor und scheint daher von großer Bedeutung zu sein (39). Beim Versuch, die für die FVIII Bindung relevanten Aminosäuren im Faktor IX Gen zu identifizieren, entdeckten Chang und Kollegen, dass ein Austausch der Aminosäure Arginin zu Alanin an Position 338 die Gerinnungseffizienz um das 3-fache steigert. Aus ihrer Arbeit geht zudem hervor, dass es sich hierbei um eine sogenannte *Exosite* handeln muss, an der zum einen das Substrat FX als auch der nicht kompetitive Inhibitor Heparin binden kann. Durch den Wechsel zu einer kleineren neutraleren Aminosäure werden beide Affinitäten deutlich abgeschwächt und zeitgleich der Zugang zur aktiven Seite mit Hilfe des Kofaktors FVIII erleichtert (28). Die FIX Padua Mutation wurde erstmals 2009 durch Paolo Simioni und Kollegen beschrieben. Ursprung dieser Entdeckung war die Einlieferung eines jungen Mannes in das Universitätsklinikum der italienischen Stadt Padua mit der für sein Alter ungewöhnlichen Diagnose einer Venenthrombose im rechten Unterschenkel. Die Gerinnungsdiagnostik zeigte eine 8-fach erhöhte FIX Aktivität bei physiologischen Antigen Spiegeln. Bei den Familienangehörigen zeigte sich bei der Mutter und einem Bruder eine 3-fach respektive 5-fach erhöhte FIX Aktivität. Die Gerinnungsdiagnostik des anderen Bruders sowie des Vaters blieb ohne Befund. DNA Analysen ergaben letztendlich einen Austausch der Aminosäure Arginin gegen Leucin an Position 338 im FIX Gen, wobei die Mutter heterozygot und die beiden gerinnungsdiagnostisch auffälligen Brüder homozygote Träger dieser Mutation sind (196). Neben der Padua Variante wurden *in vitro* noch weitere Varianten identifiziert (111;114;133;162;170;195) die ebenfalls eine Steigerung der FIX Aktivität um das 2- bis 5-fache bewirken, allerdings konnten die Mechanismen, auf denen die Steigerung basiert, bislang nicht aufgeklärt werden (183). Die Verwendung der Padua Variante in präklinischen Studien in Hämophilie B Mäusen (23;38) und Hunden (38;54) zeigte einen deutlichen Vorteil aufgrund der 5- bis 8-fach gesteigerten Aktivität gegenüber dem Wildtyp FIX ohne Auffälligkeiten hinsichtlich Thrombogenität und Immunogenität, sodass derzeit eine Weiterentwicklung zum Einsatz in der Hämophilie B Gentherapie in klinischen Studien getestet wird.

### 1.3 Gentherapie der Hämophilie B

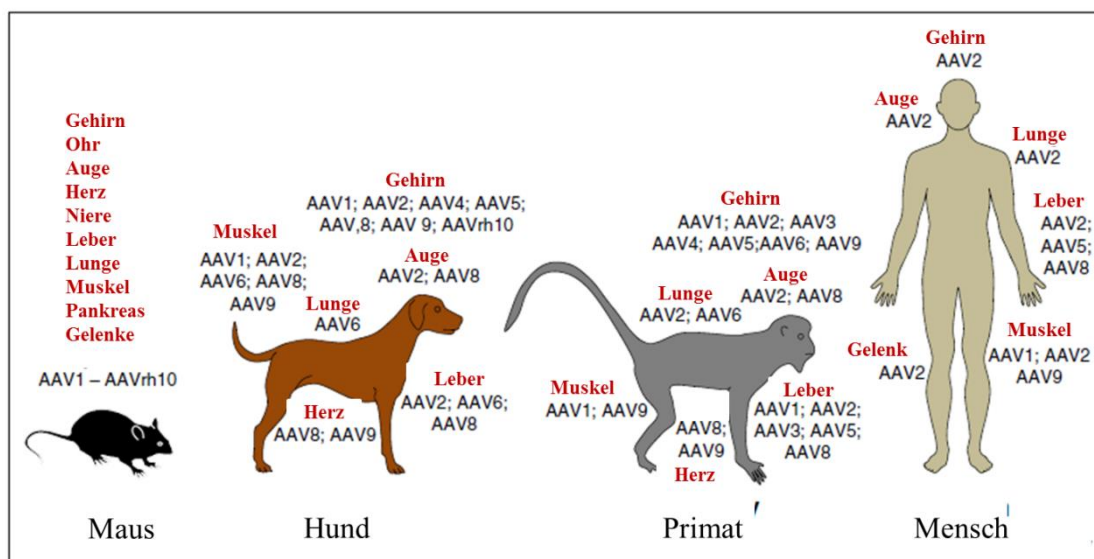
Die Hämophilie eignet sich unter anderem aufgrund des monogenetischen Defekts besonders gut für den Einsatz einer Gentherapie. Zudem sind die erforderlichen Messparameter in der Gerinnungsdiagnostik sehr gut etabliert und auch die Frequenz der spontan auftretenden Blutungsereignisse kann als Endpunkt Analyse heran gezogen werden. Des Weiteren kann auch eine nur geringe Verbesserung der Restaktivitäten des jeweiligen Gerinnungsfaktors eine schwere Verlaufsform zu einer moderaten Verlaufsform korrigieren, wodurch die Lebensqualität der Patienten deutlich verbessert wird. In ersten Studien wurden integrierende Vektorsysteme für den Einsatz in der Gentherapie heran gezogen, allerdings wurden diese aufgrund von Sicherheitsaspekten durch nicht-integrierende Adeno-assoziierte Vektoren ersetzt (100;136). Dennoch konnte in präklinischen Studien an Mäusen mittels DNA Sequenzierung eine Integration von AAVs ins Genom nachgewiesen werden (148). Zudem konnte in einem einzigen Fall die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms nach AAV Gentherapie in einer Maus in Zusammenhang gebracht werden (49). Aus diesem Grund war zum einen die Verwendung von geringen Vektordosen, sowie die Restriktion der Transduktion auf vornehmlich postmitotische Hepatozyten Gegenstand der präklinischen Forschung um die zuvor beschriebenen Risiken aufs Minimum zu reduzieren (27).

#### 1.3.1 Adeno-assoziierte Viren (AAV)

Adeno-assoziierte Viren gehören zur Familie der Parvoviridae und zählen mit einer Größe von nur 22 nm zu den kleinsten derzeit bekannten Viren. Die erste Entdeckung erfolgte 1965 durch Atchinson und Kollegen. Sie beobachteten eine hohe Anzahl an Virus-ähnlichen Partikeln in der Kultur von Nierenzellen, welche zuvor mit einem Simian Adenovirus Typ 15 (SV15) infiziert wurden. Aufgrund der zeitgleich benötigten Infektion mit einem Adenovirus zur Replikation wurden diese Viruspartikel daraufhin als Adeno-assoziierte Viren bezeichnet (6). Der Lebenszyklus eines AAVs lässt sich in die latente und die lytische Phase unterteilen. In Abwesenheit eines Helfervirus bildet der AAV eine Latenz durch Integration in das Wirtsgenom aus. Die Integration erfolgt hierbei vornehmlich in eine bestimmte Stelle im Chromosom 19, der sogenannten AAV Integrations Stelle 1 (12). Die lytische Phase wird durch eine zusätzliche Infektion der

AAV infizierten Zellen mit einem Helfervirus initiiert. Sie ist charakterisiert durch die Exzision des Provirus aus dem Genom der Wirtszelle, Replikation, Genexpression der viralen Gene sowie die Verpackung der neuen AAV Partikel und abschließender Helfervirus induzierter Lyse der Wirtszelle mit einhergehender Freisetzung der Viruspartikel. Das Genom der AAVs besteht aus einer linearen einzelsträngigen DNA mit einer Gesamtlänge von circa 4,7 kbp. Die beiden offenen Leserahmen (ORF – *open reading frame*) werden auf beiden Seiten von sogenannten *inverted terminal repeats* (ITR) umspannt. Die ITRs bestehen aus einer 125 bp langen palindromischen Sequenz und bilden aufgrund dessen auf beiden Seiten eine Haarnadelschleife durch komplementäre Basenpaarung als Sekundärstruktur aus. Durch die Ausbildung der Sekundärstruktur wird eine 3'Hydroxylgruppe frei gelegt, an der direkt die DNA Replikation erfolgen kann. Der linke ORF kodiert für die zur Replikation benötigten Proteine Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40. Die Aktivierung der Transkription erfolgt über die beiden Promotoren P5 und P40, welche wiederum erst durch die Infektion mit einem Helfervirus aktiviert werden. Der rechte ORF kodiert für die viralen Hüllproteine VP1, VP2 und VP3. Die Transkription von VP1 wird durch die Aktivierung des Promoters P40 initiiert, und die beiden anderen Proteine VP2 und VP3 entstehen als Spleißvarianten von VP1. Das ikosaedrale Kapsid der AAVs wird schließlich durch die Zusammenlagerung von circa 60 dieser Hüllproteine in einem molaren Verhältnis von 1:1:10 gebildet (96;178). Neben der beschützenden Funktion für das virale Genom hat das Kapsid Einfluss auf die Bindung an die Membran von Wirtszellen und erfüllt zudem wichtige Funktionen beim intrazellulären Transport. Die Infektion ist ein mehrstufiger Prozess initiiert durch die Anheftung des AAV an Serotyp-spezifische Rezeptoren auf der Membran der Wirtszelle. Verschiedene Serotypen verwenden dabei spezifische Rezeptoren, wobei vorwiegend Glykane auf der Zelloberfläche als primäre Rezeptoren fungieren. Aufgrund dessen können die bis dato entdeckten 13 AAV Serotypen in drei Kategorien gruppiert werden: Die Serotypen AAV2 (203), AAV3 (190), AAV6 (193) und AAV13 (191) verwenden Heparan Sulfat Proteoglykan als Primärrezeptor, die Sialinsäure wird von den Serotypen AAV1 (218), AAV4 (210), AAV5 (211) und AAV6 (218) bevorzugt, und der AAV9 (194) Serotyp bevorzugt eine N-verknüpfte Galaktose. Für die übrigen Serotypen AAV7, AAV8, AAVrh10, AAV11, und AAV12 konnten bisher experimentell keine spezifischen Primärrezeptoren auf der Zelloberfläche identifiziert

werden (198). Da es sich bei den oben genannten Primärrezeptoren um weit verbreitete Glykane handelt, wird die in Abbildung 1.4 dargestellte Gewebespezifität durch die Verwendung von Sekundärrezeptoren weiter erhöht. Hierbei konnten für den AAV2 Serotyp der *fibroblast growth factor receptor 1* (FGFR1) (169) sowie die Integrine  $\alpha V\beta 5$  (202) und  $\alpha V\beta 1$  (4) als Sekundärrezeptoren identifiziert werden. Der *hepatocyte growth factor receptor* (HGFR) dient den beiden Serotypen AAV2 (99) und AAV3 (115) als Sekundärrezeptor, wohingegen der *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) mit dem AAV5 Serotyp interagiert (120). Für den AAV6 Serotyp konnte der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) als Interaktionspartner nachgewiesen werden (213). Der zum Beispiel auf Epithelzellen weit verbreitete Laminin Rezeptor wird hingegen überwiegend von den Serotypen AAV2, AAV3, AAV8 und AAV9 als Sekundärrezeptor verwendet (2).



**Abbildung 1.4:** AAV Serotypen und ihre Gewebespezifität aufgrund unterschiedlicher Primär- und Sekundärrezeptor Affinitäten. Modifiziert nach (198).

Die Internalisierung der AAVs wird durch eine Rezeptor-vermittelte Endozytose eingeleitet, wobei drei verschiedene Endozytose Mechanismen für diesen Prozess beschrieben wurden: Eine Dynamin abhängige Endocytose, die Bildung von Clathrin ummantelten Vesikeln sowie die Makropinozytose (9;50;131). Nach der Internalisierung der AAVs erfolgt der intrazelluläre Transport über das endosomale Kompartiment (47;48). Der geringe pH-Wert in Endosomen führt zu Konformationsänderungen innerhalb des Kapsids, wodurch es zur Exposition der N-terminalen Phospholipase A2

Domäne und des Kernlokalisierungssignals von VP1 kommt. Diese beiden Signale führen zur Freisetzung der AAVs aus dem endosomalen Kompartiment und dem Transport über den Golgi Apparat und das Endoplasmatische Retikulum zum Zellkern (74). Wie genau der AAV die Kernmembran passiert, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Zudem besteht nach wie vor die Diskussion, ob das Kapsid vor, während oder erst nach dem Eintritt in den Nukleus entfernt wird (97;121;219). Die Produktion der AAV Partikel für klinische Studien erfolgt entweder in der humanen HEK293T Zelllinie oder in Insektenzellen, welche zudem eine zeitgleiche Infektion mit dem Baculovirus 12 benötigen. Die Verwendung von Insektenzellen liefert zwar hochtitrige rekombinante (r)AAV Präparationen, dennoch scheint es deutliche Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation der Hüllproteine zu geben (75), welche eine bedeutsame Rolle in der Infektion der Wirtszelle und dem intrazellulären Transport spielen. Zur Verabreichung der rAAV Partikel wurden bisher 40 verschiedene Gentransfer Protokolle von der FDA (*Food and Drug Administration*) genehmigt (42), welches den progressiven Fortschritt dieser Therapieform verdeutlicht. Innerhalb der letzten 15 Jahre wurden zudem circa 300 Hämophilie B Patienten mittels AAV Gentherapie behandelt, und die ersten Langzeitbeobachtungen zeigen keine großen Sicherheitsbedenken in Hinblick auf Lebertoxizitäten und die Entstehung von hepatozellulären Karzinoma (68;70;127;132;141;152-154).

### 1.3.2 Klinische Studien

Die erste Gentherapiestudie in Hämophilie B Patienten erfolgte durch intramuskuläre Injektion eines AAV2 FIX Vektors in einer Dosis von  $2 \times 10^{11}$ - $1,8 \times 10^{12}$  vg/kg. Zwar wurden in dieser Studie nur geringe Aktivitäten von unter 2% erreicht, allerdings konnte die FIX Expression im Muskel der Patienten über einen Zeitraum von 10 Jahren nachgewiesen werden (20;94;126). Der gleiche Vektor wurde daraufhin nur drei Jahre später in unterschiedlichen Dosen direkt in die Leberarterie von Hämophilie Patienten infundiert. Ein Patient aus der hohen Dosis Gruppe erreichte sogar kurzweilig eine FIX Expression von 11% (127). Hierbei erfolgte auch erstmals die Beobachtung eines Anstiegs von Transaminasen mit einhergehendem Verlust der FIX Expression bereits vier Wochen nach erfolgter Gentherapie. Der Anstieg von Transaminasen ist medizinisch zudem immer ein Indikator für eine Leberschädigung. Der



Transaminasenanstieg wurde ebenfalls in abgeschwächter Form in der mittleren Vektordosis von  $4 \times 10^{11}$  vg/kg beobachtet und zudem erstmals mit einer zeitgleich auftretenden T Zellvermittelten Immunantwort gegen das verwendete AAV Kapsid in Verbindung gebracht. Die erste wirklich erfolgreiche Gentherapie wurde gemeinschaftlich von Forschern des St. Jude Kinderkrankenhauses und der Londoner Universität durchgeführt. Hierbei wurde erstmals ein selbst komplementärer Vektor des Serotypes 8 verwendet mit einem Kodon optimierten FIX als Transgen (153). In der Studie wurden zehn Hämophilie Patienten in drei verschiedenen Dosis Stufen mit  $2 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$  und  $2 \times 10^{12}$  vg/kg behandelt. Über einen Zeitraum von mehr als zwei Jahren wurde eine anhaltende und zugleich dosisabhängige FIX Expression von 1-6% in allen behandelten Patienten beobachtet. Zusätzlich konnte klinisch eine deutliche Reduktion der spontanen Blutungsereignisse erzielt werden. Allerdings wurde in dieser Studie ebenfalls ein Anstieg an Transaminasen in vier von sechs mit der hohen Vektordosis behandelten Patienten beobachtet. Trotz eingeleiteter Gegenmaßnahmen wie der Gabe von Corticosteroiden wurde daraufhin eine FIX Reduktion von 50-70% verzeichnet (152). Trotzdem konnte in der Langzeitbeobachtung der Patienten eine stabile Expression über einen durchschnittlichen Zeitraum von sechs Jahren nachgewiesen werden (149). Ähnliche Ergebnisse konnten bei einer Studie unter Anleitung der Firma uniQure verzeichnet werden. Hierbei wurde allerdings als Kapsid der AAV5 Serotyp anstelle von AAV8 verwendet (132). Jeweils fünf Patienten wurden in der geringen Dosis von  $5 \times 10^{12}$  vg/kg und weitere fünf Patienten in der hohen Dosis mit  $2 \times 10^{13}$  vg/kg behandelt. Auch hierbei zeigte sich eine langanhaltende und dosisabhängige Expression von FIX zwischen 4 und 7% mit einhergehender Reduktion der spontanen Blutungsereignisse. Als Besonderheit in dieser Studie erfolgte zwar in drei Patienten ein Anstieg der Transaminasen, allerdings ohne Einfluss auf die FIX Expression. Zudem konnten in dieser Studie keine T Zellvermittelte Immunantwort nachgewiesen werden. Von den Autoren wird hierbei zum einen eine mögliche geringere Immunogenität des AAV Serotyps 5 an sich diskutiert (40). Zum anderen könnte der Transaminasenanstieg ohne die zeitgleiche Eliminierung der transduzierten Hepatozyten ein Anzeichen für einen alternativen Lebertoxizitäten auslösenden Mechanismus sein. Demnach könnte die primär aufs perivaskuläre Umfeld beschränkte Transduktion der Hepatozyten zu einer Stressreaktion, ausgelöst durch eine drastisch

erhöhte Proteinexpression, führen (132). Insgesamt wurde das Ziel die Hämophilie von einem schweren zu einem moderaten, teilweise sogar milden Schweregrad, zu korrigieren erreicht. Dennoch eröffneten sich durch die Entdeckung der Padua Variante aktuell ganz neue Möglichkeiten in der weiteren Entwicklung der Hämophilie B Gentherapie (196). Nach erfolgreich durchgeführten präklinischen Studien in Tiermodellen wie der Maus (141) und dem Hund (38) erfolgte die Translation auf den Mensch. Als Vektor wurde hier ebenfalls ein selbstkomplementärer AAV mit einem eigens von der Firma Spark entworfenen Kapsid verwendet. Als Transgen diente hier ebenfalls ein Kodon optimierter FIX mit der Padua Mutation und dem obligatorischen leberspezifischen LP1 Promoter (NCT02484092) (70). Mit Verwendung der hyperaktiven FIX Variante wurde erstmals eine FIX Expression von durchschnittlich 34% erzielt mit einhergehendem fast vollständigem Ausbleiben von spontanen Blutungen. Allerdings wurde auch in dieser Studie in zwei der insgesamt zehn behandelten Patienten ein Anstieg der Transaminasen beobachtet und trotz zügiger Behandlung mit dem Corticosteroid Prednisolon konnte ein Expressionsrückgang von 48% auf 18% FIX Aktivität in einem Patienten nicht verhindert werden. Die Langzeitbeobachtung in Hinblick auf eine stabile Expression und Sicherheit ist zurzeit noch nicht abgeschlossen (NCT03307980). Die neueste Phase I Studie verwendet ebenfalls das bereits beschriebene Padua Transgen, allerdings mit einem synthetischen AAV Kapsid, welches keinerlei Immunreaktionen provozieren soll. Bisher wurden zwei Patienten mit einer Dosis von  $4,5 \times 10^{11}$  vg/kg behandelt und erreichten eine FIX Expression von über 40%. Bislang wurde in keinem der beiden Patienten ein Anstieg von Transaminasen oder ein Rückgang der FIX Expression beobachtet (NCT03369444). Alle derzeit für die Hämophilie B Gentherapie relevanten und aktuellen Studien sind in Tabelle 1.2 zusammen gefasst.

**Tabelle 1.2:** Aktuelle Hämophilie B AAV Gentherapie Studien. co: Kodon optimiert; sc: selbst-komplementär; SJCRH: Kinderkrankenhaus St. Jude; UCL: Universität London; vg: Vektorgenome; wt: Wildtyp. Modifiziert nach (10).

Sponsor	NCT	Studie	AAV	Vektor Dosis (vg/kg)	Phase
<b>SJCRH/ UCL</b>	NCT00979238	n/a	scAAV2/8-LP1-FIXco-wt	$2 \times 10^{11}$ , $6 \times 10^{11}$ , $2 \times 10^{12}$	1
<b>Shire (Baxalta)</b>	NCT01687608	AskBio009	AAV8.sc-TTR-FIXco-Padua	$2 \times 10^{11}$ , $1 \times 10^{12}$ , $3 \times 10^{12}$	1,2
<b>uniQure</b>	NCT02396342	AMT-060-01	AAV5-FIXco-wt	$5 \times 10^{12}$ , $2 \times 10^{13}$	1,2
	NCT03489291	AMT-061-01	AAV5-FIXco-Padua	$2 \times 10^{13}$	2
	NCT03569891	AMT-061-02	AAV5-FIXco-Padua	$2 \times 10^{13}$	3
<b>Pfizer (Spark)</b>	NCT02484092	SPK-9001-101	AAV-Spark100-FIXco-Padua	$5 \times 10^{11}$	2
	NCT03307980	SPK-9001-LTFU		Dosis Studie	2
	NCT03861273	BENEGENE-2		n/a	3
<b>UCL</b>	NCT03369444	FLT-180a	AAV53-FIXco-Padua	$6 \times 10^{11}$ , $2 \times 10^{12}$	1
<b>Freeline</b>	NCT03641703			Dosis Studie	2,3

### 1.3.3 Immunantworten ausgelöst durch die AAV Gentherapie

Die Immunantworten ausgelöst durch die AAV Gentherapie können vielfältig ausfallen. Hierbei spielt die erworbene Immunität eine deutlich größere Rolle als die angeborene Immunität. Die erworbene Immunität kann des Weiteren in eine humorale und eine zellvermittelte Immunantwort klassifiziert werden (Abbildung 1.5).

#### 1.3.3.1 Die humorale Immunantwort

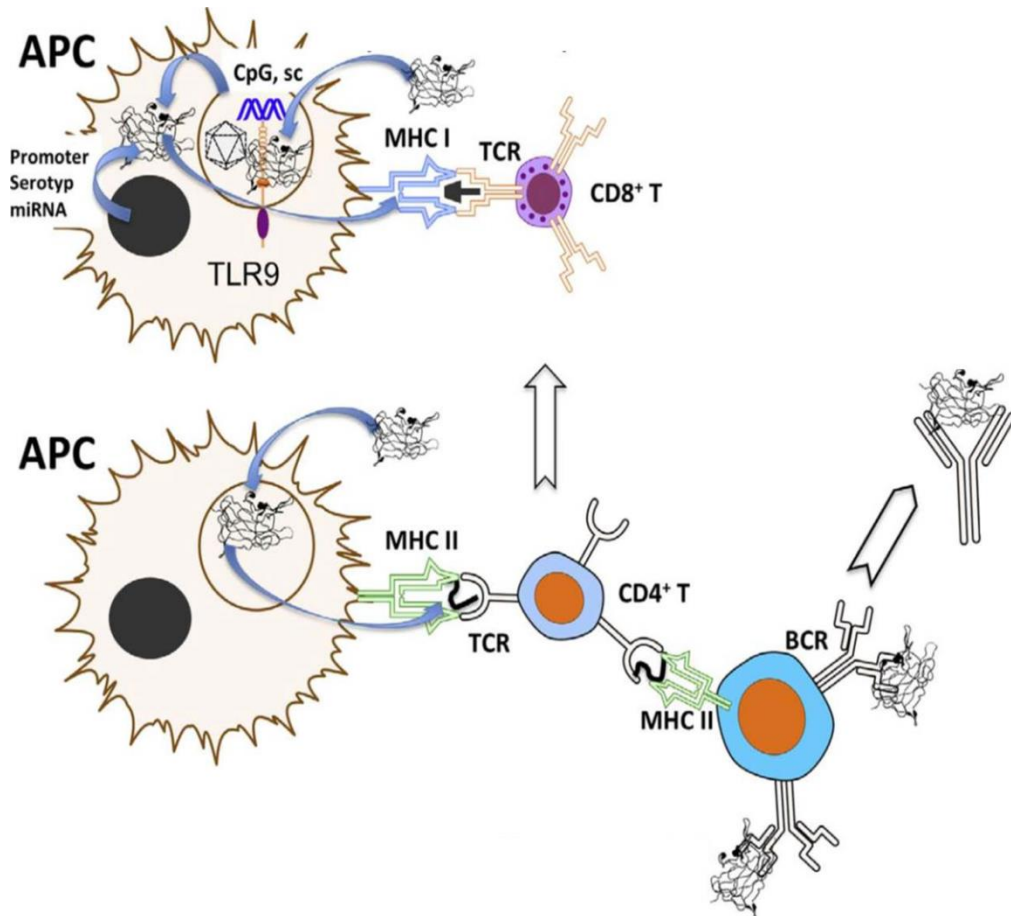
Bei der humoralen Immunantwort ist das Auftreten von sogenannten neutralisierenden Antikörpern von entscheidender Bedeutung. Dies zeigte sich bereits in der ersten Gentherapie Studie bei Hämophilie B Patienten. Zwei Patienten wurden mit einer Vektordosis von  $2 \times 10^{12}$  vg/kg infundiert. Einer der Patienten zeigte im Rahmen einer Voruntersuchung einen sehr hohen Antikörpertiter gegen das verwendete AAV Kapsid, dessen Konsequenz eine vollkommene Neutralisierung der infundierten Vektorpartikel gewesen ist. Der andere Patient hingegen wies nur einen recht geringen Titer auf und erreichte in Folge der Gentherapie eine FIX Expression von 10% (127). Das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern stellt daher das zurzeit wichtigste Ausschlusskriterium zur Teilnahme an der Gentherapie dar. Dies ist insofern relevant,

da eine bedeutende Anzahl an Menschen während ihrer Kindheit Kontakt mit AAVs hatten und in Folge dessen eine humorale Immunität gegen ebendiese erworben haben (22;107). Eine vergleichende Studie in 44 Hämophilie B Patienten konnte zeigen, dass 95% der Patienten neutralisierende Antikörper gegen den AAV2 Serotyp entwickelt hatten, welche zudem auch überdurchschnittlich häufig im hochtitrigen Bereich gemessen wurden. Vergleichsweise liegen die in der Hämophilie B Gentherapie häufig verwendeten Serotypen AAV5 und AAV8 mit einer neutralisierenden Antikörper Prävalenz bei 66% beziehungsweise 64%. Interessanterweise sind diese Serotypen auch vermehrt mit einem geringeren Antikörpertiter assoziiert (122). Zusätzlich ist der hohe Grad der Konservierung der Aminosäure Sequenz der unterschiedlichen Serotypen von Nachteil, da mit hoher Wahrscheinlichkeit Kreuzreaktionen auftreten (66). Eine Widerlegung dieses Dogmas konnte kürzlich im Verlauf der von uniQure gesponserten klinischen Studie (NCT02396342) zur Gentherapie der Hämophilie B unter Verwendung des AAV5 Serotyps erzielt werden. Unter Verwendung eines sensitiveren Testsystems konnten 3 von 10 Patienten mit bereits existierenden neutralisierenden Antikörpern gegen das AAV5 Kapsid identifiziert werden ohne eine korrelierende schlechtere Transduktionseffizienz (122). Aus diesem Grund wurden in der darauf aufbauenden klinischen Studie, mit Verwendung der FIX Padua Variante, keine Patienten mit neutralisierenden Antikörpern mehr ausgeschlossen und bis dato konnten auch in diesen Patienten therapeutische FIX Spiegel von 25% bis 51% erzielt werden (NCT03569891).

### 1.3.3.2 Die Zellvermittelte Immunantwort

Im Gegensatz zur humoralen Immunantwort aufgrund bereits existierender neutralisierender Antikörper gegen verschiedene AAV Serotypen steht die zellvermittelte Immunantwort. Dieses Phänomen wurde bereits in der ersten lebergerichteten Gentherapie zur Behandlung der Hämophilie B beobachtet. Die Infusion von AAV2 Partikeln mit FIX als Transgen in einer hohen Dosis von  $2 \times 10^{12}$  vg/kg führte zwar anfänglich zu einer FIX Expression von 10%, diese ging allerdings nach 4-6 Wochen auf den Ausgangswert von unter 1% zurück. Auffällig hierbei war der in diesem Zeitraum verzeichnete Anstieg von Transaminasen (127). Das gleiche Phänomen wurde auch in einem nachfolgenden Patienten mit einer geringeren Dosis an

AAV Partikeln beobachtet. Die Analyse der PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) mittels IFN- $\gamma$  ELISpot (*Enzyme linked immuno spot Assay*) zeigte eine klare Immunantwort gegen das verwendete AAV Kapsid. Anhand dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass von Hepatozyten aufgenommene AAVs nicht vollständig von der Zelle degradiert wurden und somit Bestandteile des Kapsids über den MHC I Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert wurden. Dadurch kam es zur Expansion von bereits vorhandenen Kapsid-spezifischen CD8<sup>+</sup> Zellen und folglich zur Eliminierung von transduzierten Hepatozyten und einem Anstieg an Transaminasen (siehe Abbildung 1.5) (138). Diese Hypothese konnte durch *in vitro* durchgeführte Studien unterstützt werden, obwohl die genauen Mechanismen nach wie vor nicht gänzlich aufgeklärt werden konnten (53;164). Dieselbe Kinetik des Verlustes der mittels Gentherapie erreichten FIX Expression mit Zunahme an Transaminasen und dem Auftauchen von Kapsid-spezifischen zytotoxischen T Zellen wurde auch in einer nachfolgend durchgeführten klinischen Studie beobachtet (153). Diese Immunreaktion war insofern unerwartet, als sie in der Art in keiner präklinischen Studie zur lebergerichteten Gentherapie beobachtet wurde. Weder in Mäusen, noch in Hunden oder Primaten konnte eine Eliminierung von transduzierten Hepatozyten mit einhergehendem Aktivitätsverlust nachgewiesen werden (83;112). Zur Prävention oder spätestens nach dem ersten Anstieg der Transaminasen ist man dazu übergegangen immunsupprimierende Medikamente wie beispielsweise Prednisolon zu verabreichen (59;137;152).



**Abbildung 1.5:** Mechanismus der humoralen und zellulären Immunantwort nach AAV Gentherapie. APC: Antigen präsentierende Zelle; MHCI/II: Haupthistokompatibilitätskomplex I/II; TCR: T Zell Rezeptor; BCR: B Zell Rezeptor; TLR9: *Toll-like* Rezeptor 9. Modifiziert nach (84).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Über die letzten Jahre hinweg hat die Entwicklung einer Gentherapie für die Hämophilie B herausragende Fortschritte gemacht. Das zunächst angestrebte Ziel die Gerinnungsfaktor Aktivitäten über den Schwellenwert von 1% anzuheben, wurde deutlich überschritten. Dies wurde zum einen durch die Optimierung der Verabreichungstechnik, die Kodon Optimierung des Transgens zur Steigerung der Translation, die Verwendung von in der menschlichen Leber besonders effektiven und vor allem selbst komplementären AAV Serotypen und die Entwicklung von starken, aber dennoch Leberspezifischen Promotoren erreicht. Diese Optimierungen ermöglichten bereits ein Expressionsmaximum des FIX von 12% (132;150;152-154). Dies wurde darüber hinaus noch durch die Entdeckung und Verwendung der FIX Padua Mutante gesteigert (69). Allerdings zeigte sich in den meisten klinischen Studien der Anstieg von Transaminasen und damit einhergehend der teilweise oder völlige Verlust der bis dahin erreichten FIX Expression als großes Problem. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die Präsentation von Kapsid Strukturen über die MHCI und MHCII Komplexe und die damit einhergehende Aktivierung von humoralen und zellulären Immunantworten, deren Folge letztendlich die Eliminierung von transduzierten Hepatozyten war. Der genaue Mechanismus zur Entstehung dieser Immunreaktion ist noch nicht vollends aufgeklärt (84;135;137;138). Zudem führte die überwiegend perivaskuläre Transduktion von Hepatozyten nach AAV Gentherapie zu einer Stressreaktion, ausgelöst durch eine übermäßig hohe Proteinexpression (132). In beiden Mechanismen korrelieren die Lebertoxizitäten mit der verwendeten Vektordosis. Ziel ist es daher die Gentherapie so zu optimieren, dass mit relativ geringen Vektordosen eine dennoch ausreichend hohe FIX Expression erreicht werden kann. Daher ist die Verwendung von hyperaktiven FIX Varianten in der AAV Gentherapie eine mögliche Option dieses Ziel der Vektorreduktion zu erreichen.

Aufbauend auf der FIX Padua Variante (196) wurden in diesem Labor zwei weitere hyperaktive FIX Varianten mittels Aminosäuresubstitution generiert, die LW und die K LW Variante. Diese sollten anschließend vergleichend zur FIX Wildtyp und Padua Variante sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert werden. Hierzu wurden die folgenden Zielsetzungen definiert:

- Die Herstellung von stabil FIX exprimierenden HEK293T/WT, HEK293T/Padua, HEK293T/LW und HEK293T/KLW Zelllinien zur Protein Produktion im großen Maßstab.
- Etablierung der Aufreinigung rekombinanter FIX Proteinvarianten mittels Anionen-Austausch-Chromatographie, sowie die anschließende Überprüfung auf deren Funktionalität.
- Erstellung eines pharmakokinetischen Profils sowohl nach subkutaner als auch intravenöser Injektion der rekombinanten FIX Proteinvarianten in Hämophilie B Mäusen mit besonderem Augenmerk auf die verminderte Kollagen Typ IV Bindung vermittelt durch die V10K Substitution.
- Analyse eines gesteigerten immunogenen Potentials hervorgerufen durch die Einzelnukleotidaustausche und der damit einhergehenden Entstehung neuer Epitope durch intramuskuläre sowie subkutane Injektion der aufgereinigten FIX Proteinvarianten.
- Einsatz der zuvor charakterisierten FIX Proteinvarianten in einem AAV Gentherapie Versuch an Hämophilie B Mäusen zur Effizienzbeurteilung sowie der Beurteilung der Sicherheit in Hinblick auf eine möglich gesteigerte Thrombogenität vermittelt durch die Hyperaktivität.





## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 2.1:** Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

Reagenzien	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aprotinin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BeneFIX®	Pfizer, New York, USA
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Brefeldin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
clasto-Lactacystin β-lacton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DMEM GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
dNTPs (desoxy-Nucleosidtriphosphate)	New England Biolabs, Ipswich, USA
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FIXa	Haematologic Technologies Inc., Essex Junction, USA
FS Actin®	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen Deutschland
Gerinnungsfaktor IX Mangelplasma	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen Deutschland
Gibco™ PBS Tabletten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco™ Trypsin-EDTA 0,5%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycerol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Reagenzien	Hersteller
<b>Glycin</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>HEPES</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Humanes Normalplasma</b>	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen Deutschland
<b>Imidazol-Puffer</b>	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen Deutschland
<b>Inkomplettes Freundsches Adjuvans</b>	Invitrogen, Karlsbad, Deutschland
<b>Isopropanol</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Kaliumchlorid (KCl)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Laemmli 2x Probenpuffer</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<b>LB-Agar</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>LB Medium</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Leupeptin</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Methanol</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Milchpulver</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>nAPTT Reagenz</b>	5-Diagnostics AG, Basel, Schweiz
<b>Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumcitrat</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumhydroxid (NaOH)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumorthovanadat</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<b>Opti-MEM™</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Ortho-Phenylendiamin (OPD)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<b>PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Paraformaldehyd</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Reagenzien	Hersteller
Pierce™ IP Lyse Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce™ Protein A/G Agarose	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Rompun 2% Injektionslösung	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Saccharose	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (HCl)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SmartLadder (200-10000bp)	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln, Deutschland
SOC Medium	New England Biolabs, Ipswich, USA
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tris-HCl	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vitamin K (Konakion MM 2 mg)	Roche Pharma AG, Basel, Schweiz
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (30%)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

## 2.2 Lösungen und Puffer

**Tabelle 2.2:** Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer.

Lösungen	Konzentrations- bzw. Mengenangaben
Erythrozyten Lysepuffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0,13 mM EDTA
PBS	137 mM NaCl 2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl pH 7,4
TBS Puffer	150 mM NaCl 7,7 mM Tris-HCl pH 7,5

<b>Lösungen</b>	<b>Konzentrations - bzw. Mengenangaben</b>
<b>TBS-T Puffer</b>	150 mM NaCl 7,7 mM Tris-HCl 0,1 % Tween 20 pH 7,5
<b>SDS Laufpuffer (10x)</b>	2 M Glycin 250 mM Tris-Base 35 mM SDS
<b>Tris HCl</b>	35 mM Tris-HCl pH 7,4
<b>Triton Lysepuffer</b>	25 mM HEPES 100 mM NaCl 1 mM EDTA 10 % Glycerol 0,5 % Triton X-100 1 mM Natriumorthovanadat 1 mM PMSF 10 mM DTT 1 ng/ml Aprotinin 10 ng/ml Leupeptin
<b>Puffer für die FIX Aufreinigung</b>	<b>Konzentrations - bzw. Mengenangaben</b>
<b>A0 Puffer</b>	25 mM HEPES 0,4 % Natriumcitrat 50 mM NaCl pH 6,8
<b>A1 Puffer</b>	25 mM Tris-HCl 100 mM NaCl pH 8,0
<b>A2 Puffer</b>	25 mM Tris-HCl 200 mM NaCl pH 8,0
<b>B1 Puffer</b>	25 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 20 mM CaCl <sub>2</sub> pH 8,0

<b>Puffer für den FIX ELISA</b>	<b>Konzentrations - bzw. Mengenangaben</b>
<b>Beschichtungspuffer</b>	15 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 35 mM NaHCO <sub>3</sub> pH 9,6
<b>Waschpuffer</b>	PBS-Tween (0,1% v/v) pH 7,4
<b>Verdünnungspuffer</b>	25 mM HEPES 25 mM NaCl 2,5 mM EDTA 1 % BSA 0,1 % Tween 20 pH 7,2
<b>Substratpuffer</b>	15 mM Zitronensäure 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 5,0
<b>OPD Substrat</b>	50 µM Ortho-Phenylendiamin 12 ml Substratpuffer 1 µl/ml 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

<b>Puffer für den Kollagen Typ IV solid phase binding Assay</b>	<b>Konzentrations - bzw. Mengenangaben</b>
<b>Essigsäure</b>	10 mM Essigsäure
<b>Blockierpuffer</b>	1 mg/ml BSA PBS-Tween (0,05% v/v)
<b>Inkubationspuffer</b>	0,5 mg/ml BSA PBS-Tween (0,05% v/v)

<b>Puffer für den FIX IgG ELISA</b>	<b>Konzentrations - bzw. Mengenangaben</b>
<b>Beschichtungspuffer</b>	200 mM NaHCO <sub>3</sub>
<b>Waschpuffer</b>	PBS-Tween (0,05% v/v) pH 7,4
<b>Blockierpuffer</b>	5 % Milchpulver Ad PBS-Tween (0,05% v/v)
<b>Verdünnungspuffer</b>	6 % BSA Ad PBS-Tween (0,05% v/v)
<b>Detektiionspuffer</b>	5,7 mM Natriumcitrat pH 4,5

<b>Puffer für den FIX IgG ELISA</b>	<b>Konzentrations- bzw. Mengenangaben</b>
<b>Substratpuffer</b>	112 µM Ortho-Phenyldiamin 12 ml Detektion Puffer 0,2 µl/ml 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## 2.3 Enzyme, Antibiotika und Antikörper

**Tabelle 2.3:** Liste der verwendeten Enzyme, Antibiotika und Antikörper.

<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
<b>DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Fast AP Thermosensitive alkalische Phosphatase</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Restriktions-Endonukleasen</b>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<b>Halt™ Protease Inhibitor Cocktail</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>TaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

<b>Antibiotika</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Ampicillin</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Kanamycin</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<b>Penicillin-Streptomycin</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
<b>goat anti-human FIX</b>	Affinity Biologicals Inc, Hamilton, Kanada
<b>goat anti-human FIX FITC gekoppelt</b>	Affinity Biologicals Inc, Hamilton, Kanada
<b>goat anti-mouse IgG1</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<b>IRDye® 680 RD donkey anti-mouse</b>	LI-COR Biotechnology GmbH, Bad Homburg, Deutschland
<b>mouse anti-human FIX</b>	CoaChrom Diagnostica GmbH, Maria Enzersdorf, Österreich
<b>rabbit anti-goat IgG Peroxidase gekoppelt</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

## 2.4 Plasmid

**Tabelle 2.4:** Auflistung der verwendeten Plasmide.

Plasmide	Funktion	Herkunft
<b>pCMV_dR8.2 dvpr</b>	Lentivirales Verpackungsplasmid der zweiten Generation	Zur Verfügung gestellt von Bob Weinberg (Addgene plasmid # 8455 ; <a href="http://n2t.net/addgene:8455">http://n2t.net/addgene:8455</a> ; RRID:Addgene_8455)
<b>pCMV_VSV-G</b>	VSV-G pseudotypisierte lentivirale Hüllproteine zur Herstellung von lentiviralen Partikeln in Kombination mit einem Verpackungs- und Transferplasmid	Zur Verfügung gestellt von Bob Weinberg (Addgene plasmid # 8454 ; <a href="http://n2t.net/addgene:8454">http://n2t.net/addgene:8454</a> ; RRID:Addgene_8454)
<b>pcDNA3.1_CMV_FIXWT_bghpA</b>	Ausgangsvektor für die <i>Quick Change II XL Site directed mutagenesis</i> zur Generierung der FIX Padua Variante	Zur Verfügung gestellt von Dr. Patricia Quade-Lyssy
<b>pcDNA3.1_CMV_FIXKLW_bghpA</b>	Ausgangsvektor für die <i>Quick Change II XL Site directed mutagenesis</i> zur Generierung der FIX Padua Variante	Zur Verfügung gestellt von Dr. Patricia Quade-Lyssy
<b>pCCL_Chim_GFP_WPRE</b>	Ausgangsvektor für die Klonierung der FIX Varianten aus dem pcDNA3.1 <i>Backbone</i> in das pCCL Plasmid	Zur Verfügung gestellt aus dem Georg Speyer Haus, Frankfurt, Deutschland
<b>pCCL_CMV_FIX_WT</b>	Transferplasmid zur Herstellung der lentiviralen Partikel mit FIX WT als Transgen	Zur Verfügung gestellt von Dr. Daniela Abriss
<b>pCCL_CMV_FIX_Padua</b>	Transferplasmid zur Herstellung der lentiviralen Partikel mit FIX Padua als Transgen	Diese Doktorarbeit
<b>pCCL_CMV_FIX_LW</b>	Transferplasmid zur Herstellung der lentiviralen Partikel mit FIX LW als Transgen	Diese Doktorarbeit
<b>pCCL_CMV_FIX_KLW</b>	Transferplasmid zur Herstellung der lentiviralen Partikel mit FIX KLW als Transgen	Zur Verfügung gestellt von Dr. Daniela Abriss



Plasmide	Funktion	Herkunft
<b>pDP8.ape</b>	Plasmid zur Herstellung von AAV Partikeln inklusive den adenoviralen Helfergen, sowie den AAV Hüllproteinen des Serotyps 8	Plasmid Factory GmbH & Co. KG, Bielefeld, Deutschland
<b>pscAAV_ITR2_TTR_rLuciferase_SV40pA</b>	Ausgangsplasmid zur Klonierung der AAV Transferplasmide mit der jeweiligen FIX Variante als Transgen	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hildegard Büning
<b>pscAAV_ITR2_LP1N_hucoFIX_WT_SV40pA</b>	Transferplasmid zur Generierung von AAV Partikeln mit der Kodon optimierten FIX WT Variante als Transgen	Diese Doktorarbeit
<b>pscAAV_ITR2_LP1N_hucoFIX_Padua_SV40pA</b>	Transferplasmid zur Generierung von AAV Partikeln mit der Kodon optimierten FIX Padua Variante als Transgen	Diese Doktorarbeit
<b>pscAAV_ITR2_LP1N_hucoFIX_LW_SV40pA</b>	Transferplasmid zur Generierung von AAV Partikeln mit der Kodon optimierten FIX LW Variante als Transgen	Diese Doktorarbeit
<b>pscAAV_ITR2_LP1N_hucoFIX_KLW_SV40pA</b>	Transferplasmid zur Generierung von AAV Partikeln mit der Kodon optimierten FIX KLW Variante als Transgen	Diese Doktorarbeit
<b>pMK_RQ_LPalt_hucoFIX_SV40pA</b>	Ausgangsvektor für die <i>Quick Change II XL Site directed mutagenesis</i> zur Generierung der Kodon optimierten FIX Varianten	Invitrogen GeneArt Gene Synthesis

## 2.5 Kommerziell erhältliche Kits

**Tabelle 2.5:** Liste der verwendeten kommerziell erhältlichen Kits.

Name	Hersteller
<b>AAVpro® Purification Kit (All serotypes)</b>	Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
<b>AAV real-time PCR titration kit</b>	Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

Name	Hersteller
<b>Biophen Faktor IX</b>	CoaChrom Diagnostica GmbH, Maria Enzersdorf, Österreich
<b>Biophen Faktor IXa</b>	CoaChrom Diagnostica GmbH, Maria Enzersdorf, Österreich
<b>DNeasy Blood and Tissue Kit</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>Enzygnost® TAT micro</b>	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen Deutschland
<b>Matched-Pair Antibody Set for ELISA of human Factor IX Antigen</b>	Affinity Biologicals, Ancaster, Kanada
<b>Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Plasmid Miniprep Kit I, peqGold</b>	VWR, Darmstadt, Deutschland
<b>Qiagen Plasmid Maxi Kit</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>QIAquick Gel Extraction Kit</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>Quick Change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit</b>	Agilent, Santa Clara, USA
<b>Quick Ligation™ Kit</b>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<b>Sta®-Liatest® D-Di Kit</b>	Diagnostica Stago S.A.S, Asnières sur Seine, Frankreich
<b>SYPRO™ Ruby Protein Gel Stain</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

## 2.6 Zelllinien und Kulturmedien

**Tabelle 2.6:** Auflistung der verwendeten Zelllinien sowie der Kulturmedien.

Zelllinie	Quelle
<b>AAVpro® 293T</b>	Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
<b>HEK293T (<i>Human embryonic kidney</i>)</b>	ATCC-CRL-1573

Medien	Konzentrations- bzw. Mengenangaben
<b>HEK293T Expansionsmedium</b>	DMEM GlutaMAX™ 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
<b>HEK293T Expressionsmedium</b>	Opti-MEM 1% Penicillin/Streptomycin 10 µg/ml Vitamin K

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 Bakterienkultur und Transformation

Alle Transformationen erfolgten in chemisch kompetenten *Escherichia coli* (NEB® *Turbo competent E.coli*) Bakterien der Firma New England Biolabs (NEB). Die Transformation der Bakterien mit den entsprechenden Plasmiden wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien erfolgte durch das Ausstreichen des mit Bakterien angereicherten SOC Mediums auf zuvor angewärmte Antibiotika-haltige Selektionsplatten. Die Selektionsplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden einzelne Klone selektiv gepickt und in 5 ml LB Medium inklusive entsprechendem Antibiotikum überführt. Die Bakterienkultur wurde zur Vermehrung über Nacht bei 37 °C und 250rpm geschüttelt. Ausgehend von dieser Starterkultur konnten die Bakterien für eine nachfolgende Plasmid Präparation weiter expandiert, oder nach vorausgegangener Plasmid Präparation zur Detektion positiver Bakterienklone für einen Restriktionsverdau verwendet werden.

### 2.7.2 Plasmid Präparation

Zur Gewinnung von bis zu 500 µg Plasmid wurde eine Plasmid Maxipräparation mit dem zugehörigen Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Präparation geringerer Plasmid Mengen erfolgte durch die Verwendung des Plasmid Miniprep Kits der Firma VWR. Grundlage der Plasmid Präparationen ist die reversible Bindung von Plasmid DNA an das Anionen Austausch Material in den Qiagen Säulen unter basischen und salzarmen Bedingungen sowie die reversible Bindung von DNA an Silikamembranen. Als Ausgangsmaterial diente eine über Nacht herangezogene Bakterienkultur und die Präparation wurde nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Bei der Plasmid Minipräparation erfolgte die Elution von der Säule durch Zugabe von 50 µl dH<sub>2</sub>O. Zur Aufkonzentration sowie Entsalzung wurde bei der Maxipräparation noch eine Isopropanol Präzipitation durchgeführt. Das Pellet wurde anschließend zur Entfernung des präzipitierten Salzes sowie zum Austausch des schwer verdampfbaren

Isopropanols mit 70%igem Ethanol mittels Zentrifugation gewaschen, an der Luft getrocknet und in 200 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die erhaltene Plasmid Menge wurde photometrisch bei einer Absorption von 260 nm Nanodrop ermittelt und bei Bedarf mittels dH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Das gewonnene Plasmid konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

### 2.7.3 Restriktionsverdau

Bei der Restriktion wird sich die Eigenschaft von Typ II Restriktionsenzymen zu Nutze gemacht DNA innerhalb einer definierten Erkennungssequenz zu schneiden, wobei jedes Restriktionsenzym seine spezifische Erkennungssequenz aufweist. Alle Restriktionsenzyme wurden kommerziell von der Firma NEB bezogen und der Restriktionsverdau nach folgendem Schema durchgeführt.

**Tabelle 2.7:** Schemata für den analytischen sowie präparativen Restriktionsverdau.

<b>Plasmid DNA (analytisch oder präparativ)</b>	1 µg oder 30 µg
<b>Restriktionsenzym</b>	5U pro µg DNA
<b>10x Cutsmart® Puffer</b>	0,1 Volumen
<b>dH<sub>2</sub>O (analytisch oder präparativ)</b>	Ad 20 µl / 60 µl

Hierbei wurde zwischen einer präparativen und einer analytischen Restriktion unterschieden. Die präparative Restriktion diente zur Generierung der zur Klonierung benötigten Fragmente wodurch deutlich mehr Anfangsmaterial verwendet wurde als bei der rein analytischen Restriktion. Der Restriktionsverdau selbst erfolgte für 60 Minuten (min) bei 37 °C und anschließender Auftrennung der Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese.

### 2.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der elektrophoretischen Auftrennung von DNA anhand ihrer Größe. Die Herstellung der 1-2%igen Agarose-Gele erfolgte durch Erhitzung der Agarose in TBS Puffer. Die Verwendung von 0,1 µg/µl Ethidiumbromid

ermöglichte die anschließende Visualisierung der Fragmente unter UV-Licht durch die DNA-interkalierende Eigenschaft dieses Farbstoffes. Als Größenmarker wurde der kommerziell erhältliche SmartLadder der Firma Eurogentec verwendet. Die Detektion der Fragmente erfolgte am Transilluminator der Firma BioRad.

### 2.7.5 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die für die Klonierung benötigten DNA-Fragmente wurden auf einem UV Tisch aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Auch diese Technik beruht auf der Bindung von DNA-Molekülen an Silikamembranen im salzreichen Milieu und der Elution ebendieser unter Verwendung von dH<sub>2</sub>O. Dasselbe Kit konnte auch verwendet werden um DNA Fragmente ohne vorherige Agarose-Gelelektrophorese aus PCR Ansätzen oder Restriktionsverdau Ansätzen zu isolieren.

### 2.7.6 DNA-modifizierende Enzyme und Klonierungstechniken

Für die Klonierung wird sich die Eigenschaft von TypII Restriktionsenzymen zu Nutze gemacht, DNA innerhalb einer Erkennungssequenz zu schneiden, wobei jedes Restriktionsenzym seine spezifische Erkennungssequenz besitzt. Die so erzeugten Überhänge können dann im weiteren Schritt mittels einer Ligase erneut verbunden werden. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um sogenannte *sticky ends* mit 5' oder 3' Überhängen an einzelnen Basen, welche dann mit dem komplementären Gegenstrang verbunden werden können. In manchen Fällen ist die Erzeugung komplementärer Überhänge durch die Verwendung desselben Restriktionsenzym nicht möglich, da die benötigte Erkennungssequenz nicht in beiden DNA-Sequenzen vorhanden ist. In diesem Fall ergibt sich die Möglichkeit unterschiedliche Restriktionsenzyme zu verwenden und die *sticky ends* anschließend zu *blunten*. Hierzu wurde das Klenow Fragment verwendet, welches die große Untereinheit der Polymerase I darstellt und daher durch die 5'-3' Polymerase Aktivität 5' Überhänge auffüllt und zeitgleich durch die 3'-5' Exonuklease Aktivität 3' Überhänge entfernt. Die so generierten *blunt ends* können ebenfalls in einer Ligationsreaktion miteinander

verbunden werden. Das *blunten* erfolgte direkt im Anschluss an die Gelextraktion der zur Klonierung benötigten Fragmente und wurde nach folgendem Schema durchgeführt.

**Tabelle 2.8:** Schemata für einen Ansatz zur Erzeugung von *blunt ends*.

<b>Linearisierte DNA</b>	0,1-4 µg
<b>10x Reaktionspuffer</b>	2 µl
<b>dNTP Mix, 1mM</b>	1 µl
<b>Klenow Fragment</b>	1U/1 µg DNA
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Ad 20 µl

Das *blunten* erfolgte für 10 min bei 37 °C gefolgt von einer 10-minütigen Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 75 °C. Anschließend wurde noch eine PCR Aufreinigung zur Entfernung der in der Reaktion verwendeten Enzyme, Puffer und dNTPs durchgeführt. Besonders nach dem *blunten* war es ratsam, das in der Klonierung verwendete Plasmid *Backbone* zu dephosphorylieren, um eine Re-Ligation dessen zu verhindern. Die zur Dephosphorylierung verwendete alkalische Phosphatase entfernt die 5' und 3' vorhandenen Phosphatgruppen und wurde nach folgendem Schema durchgeführt.

**Tabelle 2.9:** Schemata eines Ligationsansatzes.

<b>Linearisierte DNA</b>	1 µg
<b>10x Reaktionspuffer</b>	2 µl
<b>Alkalische Phosphatase</b>	1 µl (1U)
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Ad 20 µl

Die Dephosphorylierung erfolgte für 10 min bei 37 °C mit anschließender Hitzeinaktivierung bei 75 °C für 5 min, so dass direkt mit der Ligation fortgefahren werden konnte. Für die Ligation wurde das Quick Ligation™ Kit der Firma NEB nach Angaben des Herstellers verwendet. Im Anschluss wurden 5 µl des Ligationsansatzes in 50 µl chemisch kompetente *E.coli* transformiert (siehe Abschnitt 2.7.1).

### 2.7.7 Sequenzierung

Zur weiteren Analyse der erfolgreichen Klonierung sowie zur Überprüfung des erfolgreichen Einbaus der Mutationen in das FIX Gen wurden die mittels

Restriktionsverdau positiv befundenen Klone zur Sequenzierung an die Firma Microsynth Seqlab (Göttingen, Deutschland) gesandt. Die Vorbereitung der Proben erfolgte nach Angaben der Firma. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde mittels NCBI Nucleotide Align Software (National Center for Biotechnology Information - NCBI, Rockville Pike, USA) analysiert.

### 2.7.8 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Erzeugung der einzelnen FIX Varianten wurde das *Quick Change II XL Site directed mutagenesis* Kit der Firma Agilent (Santa Clara, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die benötigten Nukleotidaustausche in den entsprechenden Basentriplets wurden Primer, die die veränderte Sequenz beinhalten, mit dem auf der Herstellerseite verfügbaren *Quick Change Primer Design* Programm erstellt. Der Nukleotidaustausch basiert auf der Anlagerung der beiden Primer an den komplementären Strang des parentalen Plasmids gefolgt von der Verlängerung durch die PfuUltra HF DNA-Polymerase, wodurch letztendlich eine Kopie des parentalen Plasmids mit der gewünschten Mutation entsteht. Aufgrund des bakteriellen Ursprungs des parentalen Plasmids und der damit verbundenen Dam-Methylierung ist es möglich, das parentale Plasmid mit *DpnI* restlos zu verdauen, so dass am Ende nur noch die Kopie mit der gewünschten Mutation übrigbleibt. Von diesem Ansatz wurden letztendlich 2 µl in kompetente *E. coli*. Bakterien transformiert, auf Antibiotika-haltigen Selektionsplatten vorselektiert, in LB Medium expandiert und abschließend mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert.

**Tabelle 2.10:** Verwendete Primer für die zielgerichtete Mutagenese zur Herstellung der FIX Varianten.

Mutation	Sequenz
<b>R338L fwd hucoFIX</b>	5'-ggtgaaacttggtgcttaacagacaggtggcccg-3'
<b>R338L rev hucoFIX</b>	5'-ccgggccacctgtctgttaagcaccaagttcacc-3'
<b>V10K fwd hucoFIX</b>	5'-gcaagctggaagagtcaagcagggcaacctggaac-3'
<b>V10K rev hucoFIX</b>	5'-gttcaggttgcctgcttgaactcttcagcttgc-3'
<b>S377W fwd hucoFIX</b>	5'-gaggtggaaggcacctggttctgaccggcatc-3'
<b>S377W rev hucoFIX</b>	5'-gatcccggtcagaaaccaggtgccttcacctc-3'
<b>-V10K fwd FIX</b>	5'-caaagaggtataattcaggtaaattggaagttgtcaagggaaccttgagagag-3'
<b>-V10K rev FIX</b>	5'-ctctctcaaggttccttgaacaaactcttccaatttacctgaattatacctctttg-3'

Mutation	Sequenz
pcDNA3.1 R338L rev FIX	5'-atggtgaacttttagatagaagacatgtggctcgg-3'
pcDNA3.1 R338L fwd FIX	5'-ccgagccacatgtcttctatctacaaagttcaccat-3'

### 2.7.9 Klonierung von pCCL\_CMV\_FIX\_WT, Padua, LW und KLW

Zur Klonierung der lentiviralen Vektoren wurden die beiden FIX Varianten WT und KLW mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *NruI* aus dem pcDNA3.1\_CMV\_FIX\_WT/KLW\_bghpA Plasmid herausgeschnitten. Als lentiviraler *Backbone* wurde das pCCL\_Chim\_GFP\_WPRE Plasmid mit den beiden Restriktionsenzymen *PstI-HF* und *KpnI-HF* verdaut, alle Ansätze auf ein präparatives Agarose-Gel aufgetragen und die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fragmente wurden aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurden die Fragmente wie unter Abschnitt 2.7.6 beschrieben *gebluntet* und das *Backbone* zudem dephosphoryliert. Die Ligation wurde abweichend vom beschriebenen Protokoll aufgrund der *blunt ends* über Nacht bei 4 °C durchgeführt und anschließend in kompetente *E.coli* Bakterien transformiert und über Nacht bei 37 °C auf Antibiotika-haltigen Selektionsplatten inkubiert. Am nächsten Morgen wurden selektiv Klone gepickt und nochmals über Nacht bei 37 °C und 250rpm in 5 ml LB Medium mit entsprechenden Antibiotika angereichert. Positive Klone, die Plasmide mit der gewünschten FIX Sequenz beinhalten, wurden mittels Testverdau der zuvor isolierten Plasmid-DNA unter Verwendung der beiden Restriktionsenzyme *KpnI-HF* und *XhoI* identifiziert und zur abschließenden Verifikation sequenziert. Die FIX\_Padua Variante wurde durch die zielgerichtete Mutagenese ausgehend vom pcDNA3.1\_CMV\_FIX\_WT Plasmid generiert und wie bereits beschrieben in den lentiviralen *Backbone* pCCL\_Chim\_GFP\_WPRE kloniert. Die FIX\_LW Variante wurde ausgehend vom pCCL\_CMV\_FIX\_KLW Plasmid durch die Entfernung der V10K Mutation mittels zielgerichteter Mutagenese generiert. Auch die Korrektheit dieser beiden Konstrukte wurde durch Restriktionsverdau und abschließender Sequenzierung verifiziert.



### 2.7.10 Klonierung von pscAAV\_ITR2\_LP1N\_hucoFIX\_WT/Padua/LW/KLW\_SV40pA

Die Generierung der unterschiedlichen FIX Varianten erfolgte mittels serieller zielgerichteter Mutagenese im pMK\_RQ\_LPalt\_hucoFIX\_SV40pA Vektor, welcher von der Firma Invitrogen synthetisiert wurde. Anschließend erfolgte die Klonierung der FIX Varianten inklusive des LPalt Promoters in den AAV *Backbone* pscAAV\_ITR2\_TTR\_rLuciferase\_SV40pA unter Verwendung der beiden Restriktionsenzyme *XhoI* und *AgeI-HF*. Die Konstrukte wurden anschließend noch mittels Testverdau unter Verwendung der Restriktionsenzyme *EcoRI-HF* und *MluI-HF* sowie einer Sequenzierung verifiziert. Final erfolgte noch ein Austausch des ursprünglichen LPalt Promoters gegen den bereits in klinischen Studien gebräuchlichen LP1 Promoters. Hierzu wurden die pscAAV\_ITR2\_LP1N\_hucoFIX\_WT/Padua/LW/KLW\_SV40pA Varianten mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *BamHI-HF* verdaut und mit dem vorab mittels *XhoI* und *BglII* verdauten LP1 Promoter Fragment ligiert. Die Sequenzen der finalen Transferplasmide für die AAV Produktion wurde nochmals mittels Testverdau analysiert und abschließend zur Verifizierung sequenziert.

### 2.7.11 *Quantitative Real-Time PCR* (qPCR)

Zur Ermittlung der integrierten Vektorkopienzahlen in transduzierten Zelllinien sowie in Lebern von Mäusen wurde die qPCR verwendet. Hierzu wurde vorab die DNA unter Verwendung des DNeasy Blood and Tissue Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aufbereitet und die Menge an isolierter DNA am Nanodrop bei einer Absorption von 280 nm ermittelt. Bei der qPCR ist es möglich, den Amplikonzuwachs in der PCR in Echtzeit zu beobachten. Hierbei kommt die TaqMan Chemie zum Einsatz, wobei fluorogene Sonden eingesetzt werden. Diese Oligonukleotidsonden bestehen aus einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'Ende sowie einem Quencher-Farbstoff am 3'Ende. Durch die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe wird die abgegebene Fluoreszenz vom Reporter-Farbstoff mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer reduziert. Während der PCR hybridisiert die Sonde unterhalb einer der beiden Primer auf der Zielsequenz und wird durch die 5'Nukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase gespalten. Durch diese Spaltung wird zum einen die Sonde von der Zielsequenz

entfernt, wodurch die Primer Verlängerung weiter fortgesetzt werden kann, und zum anderen findet eine räumliche Trennung des Reporter-Farbstoffes vom Quencher-Farbstoff statt, wodurch es zu einer Erhöhung des Fluoreszenz Signales kommt. Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität ist hierbei proportional zur Menge des erzeugten Amplikons. Für die qPCR wurde der TaqMan Universal Master Mix II (*with UNG*) verwendet und die Reaktion nach Angaben des Herstellers am StepOne Plus Gerät der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die in der Tabelle 2.11 aufgelisteten Primer/Probe Kombinationen wurden mit Hilfe der frei verfügbaren Primer3Plus Software generiert. Zur Bestimmung der Vektorkopienzahl wurde zudem bei jeder Reaktion ein Standard mit definierten Vektorkopienzahlen mitgeführt, anhand dessen die Berechnung erfolgte. Zudem erfolgte eine Angleichung der errechneten Vektorkopienzahlen an Haushaltsgene. Im Fall der Leberpräparation wurde hierzu murines Actin herangezogen und für die HEK293T Zelllinie der humane Erythropoetin-Rezeptor (EPOR).

**Tabelle 2.11:** Verwendete Primer in der qPCR.

Primer Name	Sequenz
<b>huFIX fwd</b>	5'-aacaagtggtgttgcctctg-3'
<b>huFIX Probe</b>	5'-ccagaagtcctgtgaaccagcagtgcca-3'
<b>huFIX rev</b>	5'-cacgggtgagcttagaagtt-3'
<b>hucoFIX fwd</b>	5'-agagcaacccctgtctgaat-3'
<b>hucoFIX Probe</b>	5'-tcggcttcgagggcaagaactgcgagct-3'
<b>huco FIX rev</b>	5'-gcatctgccgttcttgatgt-3'
<b>muActin fwd</b>	5'-agagggaatcgtgcgtgac-3'
<b>muActin Probe</b>	5'-cactgccgcacacctctctccc-3'
<b>muActin rev</b>	5'-caatagtgatgacctggccgt-3'
<b>huEPORfwd</b>	5'-tgatgcttcagccaaaacc-3'
<b>huEPOR Probe</b>	5'-tggccctgatgtactctctgctcca-3'
<b>huEPOR rev</b>	5'-acttggtccctgtgatcaca-3'

## 2.8 Zellkultur

### 2.8.1 Zellkulturbedingungen

Die beiden, in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien HEK293T sowie AAVpro® HEK293T wurden in HEK293T Expansionsmedium bei 37 °C, 7% CO<sub>2</sub> sowie in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre in Inkubatoren der Firma Heraeus (Hanau, Deutschland) kultiviert. Aufgrund der Adhärenz dieser Zelllinien erfolgte das Passagieren der Zellen mittels Trypsin/EDTA Behandlung.

### 2.8.2 Lentivirus Produktion

In dieser Arbeit wurden ein Lentivirus Transferplasmid der dritten Generation und ein Verpackungsplasmid der zweiten Generation verwendet. Zudem handelt es sich um einen VSV-G (Vesikular Stomatitis Virus-Glykoprotein) pseudotypisierten Lentivirus, wodurch einerseits eine Stabilisierung der Virushülle gewährleistet wird und somit eine Aufkonzentration mittels Ultrazentrifugation ermöglicht wird. Zum anderen bietet diese Pseudotypisierung die Möglichkeit eine Vielzahl von Zellarten zu transduzieren, da die Rezeptor vermittelte Endozytose über den weit verbreitet exprimierten LDL (*low density lipoprotein*) Rezeptor erfolgt. Die Produktion der lentiviralen Vektorpartikel erfolgte in HEK293T Zellen. Hierzu wurden diese am vorausgehenden Tag in 2 T175er Zellkulturflaschen ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion zu 70-80% konfluent waren und sich somit noch in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Als Transfektionsreagenz wurde das kationische Polymer Polyetylenimin (PEI) ausgewählt, welches mit der DNA komplexiert und von den Zellen mittels Endozytose aufgenommen werden kann. Am Tag der Transfektion wurde zuerst ein Mediumwechsel durchgeführt. Zur Transfektion wurden insgesamt 35 µg der Plasmide pCMV\_dR8.2 dvpr, pCCL\_CMV\_FIX\_Variante sowie pCMV\_VSV-G in einem molaren Verhältnis von 1:2:1 in 5 ml Opti-MEM™ vermengt und zur Komplexbildung 140 µl einer 18mM PEI Lösung hinzugegeben. Der Transfektionsansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend zu den HEK293T Zellen hinzugegeben. Nach 24 Stunden (h) erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 24-48 h die Ernte der lentiviralen Viruspartikel. Hierzu wurde der Überstand abgenommen,

für 5 min bei 4 °C und 1500rpm zentrifugiert und anschließend nochmals durch einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Ultrazentrifugationsröhrchen wurden zuerst mit 10 ml einer 20%igen Saccharose Lösung befüllt und schließlich mit dem zuvor gefilterten Zellkulturüberstand vorsichtig überschichtet. Die Pelletierung der lentiviralen Viruspartikel erfolgte für 2:30 h bei 4 °C und 20.000xg. Nach erfolgter Zentrifugation wurde das Viruspellet außen am Zentrifugenröhrchen markiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 50 µl Kulturmedium resuspendiert. Aliquotiert konnten die lentiviralen Viruspartikel bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

### **2.8.3 Generierung der Zelllinien HEK293T/WT, HEK293T/Padua, HEK293T/LW und HEK293T/KLW**

Die Generierung der stabil exprimierenden Zelllinien HEK293T/WT, HEK293T/Padua, HEK293T/LW und HEK293T/KLW zur Produktion der entsprechenden rekombinanten Proteine erfolgte mittels Transduktion mit den zuvor hergestellten lentiviralen Vektoren (LV). Hierzu wurden HEK293T Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an LV transduziert und über einen Zeitraum von 2 Wochen kultiviert. Mittels qPCR (Abschnitt 2.7.11) wurde die Vektorkopienzahl an integrierten FIX Genen ermittelt und eine ausreichend FIX exprimierende Transduktion als Einzelzellklone im 96-Well Format ausplattiert. Diese Einzelzellklone wurden expandiert und hinsichtlich Vektorkopienzahl, Antigen Expression und FIX Aktivität charakterisiert. Anhand plausibel übereinstimmender Antigenmenge und FIX Aktivität, sowie einer ausreichenden Gesamtexpression wurde ein ausgewählter Klon weiter expandiert und für die Produktion und Aufreinigung der FIX Proteinvarianten verwendet.

### **2.8.4 Produktion von Adeno-assoziierten-Viren (AAV)**

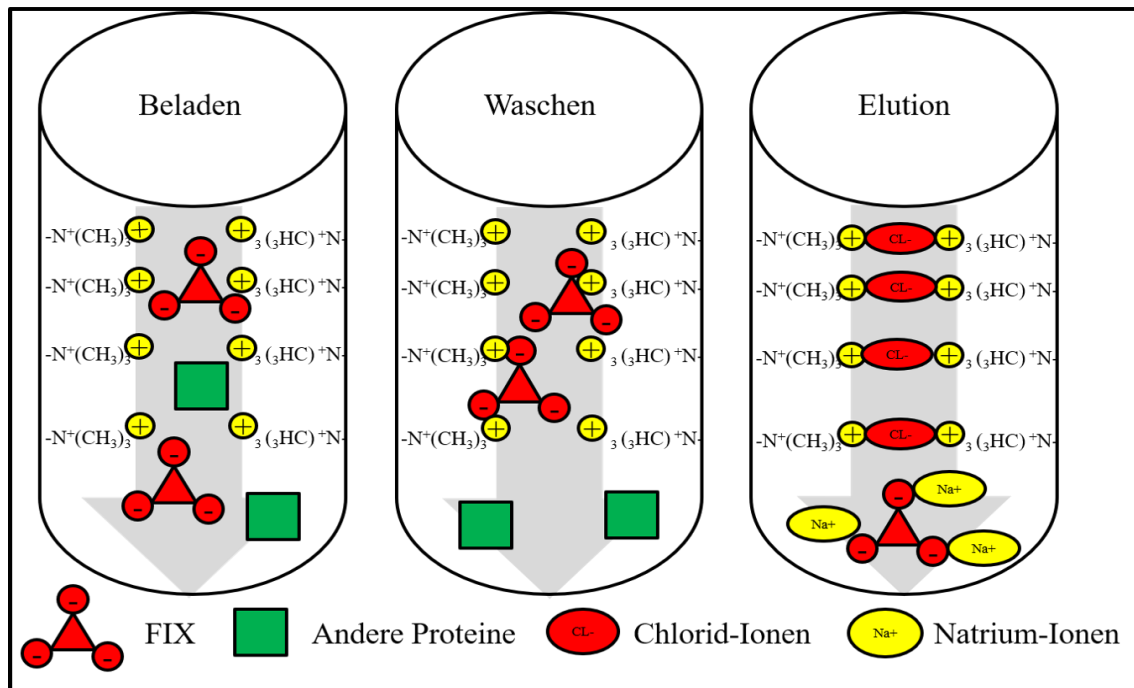
Die AAV Produktion erfolgte in der kommerziell erhältlichen Zelllinie AAVpro® 293T, welche auf eine besonders effiziente AAV Produktion selektiert wurde. Die Zellen wurden zu Beginn in jeweils 5 T225er Zellkulturflaschen auf eine Konfluenz von ca. 70% im normalen Expansionsmedium herangezogen. Am Tag der Transfektion mittels linearem PEI erfolgte zuerst ein Mediumwechsel. Für den Transfektionsansatz wurden

2,5 ml Lösung A, bestehend aus dem Transferplasmid pscAAV\_ITR2\_LP1N\_hucoFIX Variante\_SV40pA und dem AAV Plasmid pDP8.ape in einem molarem Verhältnis von 1,4:1, und 2,5 ml Lösung B mit einer 3,5-fachen Menge an PEI (1µg/µl) in Opti-MEM™ hergestellt, zur Komplexbildung zusammen gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatzes in je eine Zellkulturflasche gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Circa 24 h nach erfolgter Transfektion wurde ein Mediumwechsel zu DMEM/2%FCS vorgenommen. Nach weiteren 24 h erfolgte schließlich die Extraktion der AAV Partikel aus den transduzierten Zellen mit Hilfe des *AAVPro® Purification Kit* der Firma Takara nach Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung des Virustiters wurde dieser unter Verwendung des *AAV Titration Kit* der Firma Takara nach Angaben des Herstellers mittels qPCR bestimmt. Die Viruspartikel konnten bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden, wobei ein erneutes Einfrieren nach dem Auftauen zu vermeiden ist.

## 2.9 Proteinbiochemische Methoden

### 2.9.1 Aufreinigung der FIX Proteinvarianten mittels Anionen-Austausch-Chromatographie

Die Aufreinigung der FIX Proteinvarianten WT, Padua, LW und K LW erfolgte aus Zellkulturüberständen von zuvor generierten stabil exprimierenden HEK293T Zellen (Abschnitt 2.8.3). Um eine ausreichend hohe Proteinausbeute zu erzielen, wurden die Zellen vorab in Triple Nunc Flasks der Firma Thermo Fisher Scientific expandiert. Die Verwendung dieser Zellkulturflaschen ermöglicht es, mit einer Fläche von 500 cm<sup>2</sup> und der Stellfläche einer normalen T175er Zellkulturflasche platzsparend und besonders effizient Zellkulturüberstand mit ausreichender Proteinausbeute zu generieren. Sobald die Zellen einen dichten Zellrasen ausgebildet hatten wurde das Expansionsmedium gegen 50 ml Expressionsmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 72 h kultiviert. Anschließend wurde das abgenommene Medium für 5 min bei 1200rpm und RT zentrifugiert und über einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Über Nacht erfolgte eine Dialyse des proteinhaltigen Zellkulturüberstandes in Slide-A-Lyzer™ 10K MWCO Dialyse Kassetten der Firma Thermo Fisher Scientific gegen 5 Liter A0 Puffer zur Vorbereitung auf die nachfolgende Aufreinigung. Der Gerinnungsfaktor IX weist einen isoelektrischen Punkt von 5,2 auf. Durch die Dialyse gegen den Puffer A0 mit einem pH-Wert von 6,8 werden die ionisierbaren Aminosäuren negativ geladen. Als Säulenmaterial wurde die HiTrap Q FF Sepharose (GE Healthcare, Chicago, USA) ausgewählt. Hierbei handelt es sich um einen starken Anionen Austauscher dessen quartäre Ammoniumgruppen mit dem durch die Dialyse negativ geladenen FIX Protein interagieren. Nach 2 Waschschr itten erfolgte die Elution schließlich durch Erhöhung der Salzkonzentration und der damit einhergehenden Verdrängung des FIX Proteins von den Ammoniumgruppen. Nachfolgend an die Aufreinigung erfolgte abermals eine Dialyse der Eluate über Nacht gegen 5 Liter A1 Puffer. Die aufgereinigten Proteine konnten maximal 3 Tage bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert



**Abbildung 2.1:** Schematische Abbildung der Anionen-Austausch-Chromatographie zur Aufreinigung vom rekombinanten FIX. Das Säulenmaterial der HiTrap Q FF Säule besteht aus Sepharose mit gebundenen quartären Ammoniumgruppen auf Grund dessen es sich in einen starken Anionen Austauscher sammelt. Während der Beladung der Säule bindet der negativ geladene FIX an diese Ammoniumgruppen während in den nachfolgenden Waschschritten andere Proteine sowie Verunreinigungen von der Säule gewaschen werden. Die Elution erfolgt mit Erhöhung der Salzkonzentration und damit einhergehend der Verdrängung des FIX von den Ammoniumgruppen.

### 2.9.2 Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay

Zur Bestimmung der aus der Aufreinigung erhaltenen Proteinmenge wurde das Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Fisher Scientific nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Grundlage dieses Assays dient die sogenannte Biuret Reaktion. In Abhängigkeit der Proteinmenge werden hierbei  $Cu^{2+}$  im alkalischen Milieu zu  $Cu^{1+}$  Ionen reduziert. Die Chelation von 2 Molekülen des Chelators mit einem Kupferion resultiert in der Ausbildung eines orange-goldenen Produkts, welches bei einer Wellenlänge von 480 nm am Victor X4 (PerkinElmer, Inc., Waltham, USA) detektiert werden kann. Die Berechnung der Proteinmenge erfolgte anhand eines definierten Albumin Standards im Bereich von 20-2000  $\mu g/ml$ .

### 2.9.3 **FIX *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)**

Die Analyse der FIX Antigenkonzentrationen in den Eluaten nach Anionen-Austausch-Chromatographie, in Zellkulturüberständen sowie in Mausplasmen erfolgte mittels eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* im Sandwich Verfahren der Firma Affinity Biologicals. Hierzu wurde vorab eine 96-Well Platte mit einem Erstantikörper (1:100 in Beschichtungspuffer) beladen und für 2 h bei RT inkubiert. Für die Blockierung unspezifischer Bindestellen ist der nachfolgende dreimalige Waschschrift mit PBS-Tween (0,1% v/v) ausreichend und das Auftragen der zu bestimmenden Proben kann direkt erfolgen. Die Verdünnung der Proben erfolgte in Verdünnungspuffer und richtet sich nach der zu erwartenden Menge an FIX Antigen und der Begrenzung des verwendeten Standard Spektrums. Als Standard wurde BeneFIX® der Firma Pfizer verwendet und ebenfalls mit Verdünnungspuffer eine Verdünnungsreihe ausgehend von 5000 ng/ml hergestellt. Die Inkubation der Proben sowie des Standards erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-Tween erfolgte die Detektion der gebundenen FIX Antigene durch die Zugabe eines Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelten Zweitantikörpers (1:100 in Verdünnungspuffer). Nach einer 90-minütigen Inkubationszeit und erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Entwicklung mittels Zugabe des Ortho-Phenylendiamin (OPD) Substrates. Die Meerrettich Peroxidase katalysiert hierbei die oxidative Kupplungsreaktion von o-Phenylendiamin zu 2,3-Diaminophenazin welches, nach Abstoppen der Reaktion mit 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, als gelb-oranges Produkt bei einer Wellenlänge von 492 nm in einem Spektrometer detektiert werden kann. Die Berechnung des in den Proben enthaltenen FIX Antigens erfolgte anhand der Standardgerade unter Berücksichtigung eventuell zuvor erfolgter Verdünnungen der zu messenden Proben.

### 2.9.4 **Kollagen Typ IV *solid phase binding Assay***

Zur Ermittlung der Bindungsaffinitäten der unterschiedlichen FIX Proteinvarianten an Kollagen Typ IV wurde eine 96-Well Platte über Nacht bei 4 °C mit 10 µg/ml humanem Kollagen Typ IV, verdünnt in 0,01 M Essigsäure, beschichtet. Anschließend wurden die Wells zur Verminderung von unspezifischen Bindungen eine Stunde bei RT mit Blockierpuffer inkubiert. Von den zuvor mittels Anionen-Austausch-Chromatographie



aufgereinigten FIX Proteinen wurden jeweils 10 µg pro Well, verdünnt in Inkubationspuffer, aufgetragen und für 3 h bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden die Wells sechsmal mit Inkubationspuffer gewaschen; anschließend erfolgte die Detektion der gebundenen FIX Proteine, wie bereits unter Abschnitt 2.9.3 beschrieben, durch die Zugabe eines HRP gekoppelten Zweitantikörpers und Entwicklung mit OPD Substrat.

### 2.9.5 FIX IgG1 Antikörper ELISA

Der FIX IgG1 Antikörper ELISA dient dem Nachweis von IgG1 Antikörpern gegen humanes FIX. Hierzu wurde eine 96-Well Microtiter Platte mit 1 µg/ml BeneFIX® der Firma Pfizer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Parallel wurden Wells für eine IgG1 Standardreihe, ausgehend von einer Konzentration von 1000 ng/ml bis hin zu 15,625 ng/ml IgG1 verdünnt in Beschichtungspuffer, beschichtet. Am nächsten Morgen wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend freie Bindungsstellen für drei h bei RT mit Blockierpuffer blockiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die zu bestimmenden Proben (1:20 in Blockierpuffer) in die entsprechenden Wells pipettiert und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Gefolgt von einem weiteren Waschschriff, erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper goat anti-mouse IgG1 (1:1000 in Verdünnungspuffer) für 2 h bei 37 °C. Nach einem weiteren Waschschriff erfolgte die Inkubation mit dem Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper rabbit anti-goat IgG (1:5000 in Verdünnungspuffer) für 1 h bei 37 °C. Die Detektion wurde wie in Abschnitt 2.9.3 beschrieben durchgeführt.

### 2.9.6 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit gibt Aufschluss über die Funktionalität der einzelnen Komponenten des intrinsischen Gerinnungsweges. Die Gerinnung wird hierbei durch die Zugabe von Phospholipiden, Kalziumionen und oberflächenaktiven Substanzen, sogenannten Aktivatoren, initiiert und die Zeit bis zum Eintreten der Gerinnselbildung gemessen. Zur Analyse der funktionellen FIX Aktivität in Mausplasma, Zellkulturüberständen oder aufgereinigtem Protein wurden jeweils 25 µl der zu bestimmenden Probe mit 25 µl humanen FIX defizientem Plasma und 25 µl FS Actin® gemischt und für 3 min bei 37 °C inkubiert. Gegebenenfalls fand eine

Vorverdünnung der Proben mit Imidazol Puffer statt. Die Gerinnung wurde schließlich durch die Zugabe von 25 µl einer 25 mM CaCl<sub>2</sub> Lösung initiiert und die Zeit bis zum Eintreten der Gerinnungsbildung magnetisch mit dem Kugel Koagulometer MC4 Plus (ABW Medizin und Technik GmbH, Lemgo, Deutschland) gemessen. Die funktionelle FIX Aktivität in den gemessenen Proben wurde quantitativ anhand einer aus humanem Normalplasma generierten Standardgerade ermittelt. Im Fall von Mausplasmentestung wurde dieser Standard zusätzlich noch mit Mausplasma versetzt, um eventuelle Kreuzreaktionen mit den murinen Gerinnungsfaktoren zu berücksichtigen.

### 2.9.7 Nicht aktivierte partielle Thromboplastinzeit (naPTT)

Die nicht aktivierte partielle Thromboplastinzeit (naPTT) beruht auf demselben Testprinzip wie unter Abschnitt 2.9.6 beschrieben. Allerdings bietet der Ersatz des FS Actin® Reagenzes gegen ein naPTT Reagenz die Möglichkeit, bereits voraktivierten FIX in den Proben nachzuweisen. Dieses Reagenz enthält zwar die zur Gerinnung benötigten Phospholipide, allerdings ohne Aktivatoren, so dass eine Gerinnung nur mit bereits voraktivierten Gerinnungsfaktoren erfolgen kann. Als Normalwert wird eine Gerinnungszeit von 200-350 Sekunden angegeben (156).

### 2.9.8 Chromogener Assay gegen FIX und FIXa

Neben der Ermittlung der Aktivität von FIX oder dem Gehalt an voraktiviertem FIX mittels aPTT oder naPTT bietet der chromogene Assay eine weitere Möglichkeit zur Aktivitätsbestimmung von Gerinnungsfaktoren. Dieser wurde als Biophen FIX/FIXa chromogener Assay von der Firma CoaChrom bezogen und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In diesem Testverfahren aktiviert FXIa in Kombination mit Phospholipiden und Calcium FIX zu FIXa. Aktivierter FIX bildet zusammen mit seinem Kofaktor FVIIIa, aktiviert durch Thrombin, den sogenannten Tenase Komplex aus, welcher die Aktivierung von FX katalysiert. Der generierte aktivierte FX hydrolysiert ein chromogenes Substrat wodurch 4-Nitroanilin freigesetzt wird, welches photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden kann. Das freigesetzte 4-Nitroanilin ist hierbei proportional zur FIX Konzentration in der analysierten Probe und kann quantitativ mittels einer Standardgerade, generiert aus

humanem Normalplasma, quantifiziert werden. Zu Beginn des Assays wurden jeweils 50 µl des Standards sowie der zu analysierenden Proben in eine 96-Well Platte gegeben und 50 µl Reagenz 1 zusammengesetzt aus Humanem FX, FVIII:C sowie Fibrinpolymerisations-Inhibitoren hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde für 2 min bei 37 °C inkubiert und anschließend wurden 50 µl des Reagenzes 2 bestehend aus Thrombin, Phospholipiden sowie Kalzium hinzugefügt und nochmals für 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch die Hinzugabe des chromogenen Substrates gestartet und nach einer Inkubationszeit von 3 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 20%iger Essigsäure gestoppt. Die Quantifizierung des Farbumschlages erfolgte spektralphotometrisch am Victor X4 Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm.

### 2.9.9 SDS (Sodium-dodecyl-sulfat) Gelelektrophorese

Die Reinheit sowie Größe der aufgereinigten Proteine wurde mittels SDS Gelelektrophorese bestimmt. Hierbei erfolgte die Auftrennung der Proteine elektrophoretisch über ein 4-15%iges Mini-PROTEAN TGX Gel (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland). Zuvor wurden die Proben in 2-fachem Laemmli Puffer für 5 min bei 95 °C Hitzedenaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 100V für circa 1 h in Mini-PROTEAN Elektrophorese Zellen (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland). Als Größenmarker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder verwendet. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem SYPRO™ Ruby Protein Gel Stain Kit der Firma Thermo Fisher Scientific nach Angaben des Herstellers am Gel Doc™ System (Rad Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland).

### 2.9.10 Western Blot

Zum Nachweis von eventuell während der Aufreinigung entstandenem voraktivierten FIX, wurden jeweils 5 µg Protein mittels SDS Gelelektrophorese, wie in Abschnitt 2.9.9 beschrieben, aufgetrennt. Als Referenz wurde kommerziell erhältlicher und bereits voraktivierter FIXa, sowie BeneFIX® als klinisch angewandter rekombinanter (und mutmaßlich ganz überwiegend nicht aktivierter) FIX verwendet. Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte im Semi-Dry Blot Verfahren. Hierzu

wurden 12 Whatman Filterpapiere, die Nitrozellulosemembran sowie das Gel für 15 min in SDS Laufpuffer, inklusive 20% Methanol, voraktiviert und anschließend anodenseitig geschichtet. Der Transfer der Proteine erfolgte für 15 min bei konstanten 20mA im Trans-Blot Turbo Gerät (Rad Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland). Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers konnten Proteine auf der Membran optional mit PonceauRot angefärbt werden. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran für 1 h bei RT in 5% Milchpulver, gelöst in TBS-T inkubiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem mouse anti-human FIX Erstantikörper (1:4000 in 5% Milchpulver). Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen der Membran mit TBS-T entfernt. Die Inkubation mit dem IRDye 680 RD donkey anti-mouse Zweitantikörper (1:10.000 in TBS-T) erfolgte für 1 h bei RT. Die Membran wurde abermals mit TBS-T gewaschen und am Odyssey CLx (LI-COR Biotechnology GmbH, Bad Homburg, Deutschland) entwickelt.

### 2.9.11 Intrazelluläres Trafficking

Zur Analyse des intrazellulären Transportes sowie der Sekretion der verschiedenen FIX Proteinvarianten wurden die stabil FIX Proteinvarianten exprimierenden HEK293T Zellen mit verschiedenen Zellzytostatika behandelt. Zur Inhibierung der Proteasomen, und somit dem Proteinabbau, wurde clasto-Lactacystin  $\beta$ -lacton in einer Konzentration von 10  $\mu$ M/L verwendet. Eine Zugabe von 10  $\mu$ g/ml Brefeldin A bewirkt eine Umwandlung des Golgi Apparates zum Endoplasmatischen Retikulum und damit einhergehend eine Inhibition der Proteinsekretion. Der lysosomale intrazelluläre Transportweg wurde durch die Zugabe von 50 mM/L Ammoniumchlorid, wodurch es zu einer Anhebung des sauren pH-Wertes in Lysosomen kommt, gehemmt. Zunächst wurden am Tag zuvor jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 60 mm ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den verschiedenen Substanzen verdünnt in DMEM Medium mit 1% DMSO, 1% BSA und 1% Pen/Strep für 6 h inkubiert, wobei alle 2 h das Medium mit der entsprechenden Substanz erneuert wurde. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgenommen und zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden in 150  $\mu$ l eiskaltem Triton-Lysepuffer geerntet und für 20 min bei 4 °C lysiert. Die zellulären Überreste wurden mittels Zentrifugation bei 13000rpm und 4 °C entfernt

und das Proteinlysate in neue Reaktionsgefäße überführt, welche ebenfalls bis zur Messung bei -20 °C gelagert werden konnten. Die Messung von sekretiertem und intrazellulärem FIX erfolgte schließlich unter Verwendung des FIX ELISA (siehe Abschnitt 2.9.3).

### 2.9.12 Immunpräzipitation

Um Aussagen über eine zumindest quantitativ identische Glykosylierung der verschiedenen FIX Proteinvarianten zu treffen wurden die entsprechenden HEK293T Zellen zu  $1 \times 10^6$  in 6 Wells ausgesät und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die geringe Ausbeute an sezerniertem FIX bedingt durch die kurze Inkubationszeit sowie der geringen Zellzahl erforderte eine vorausgehende Immunpräzipitation. Hierzu wurden die Zellen mittels Zentrifugation für 5 min bei 1200rpm geerntet, das Zellpellet in 500 µl IP-Lysepuffer inklusive Halt™ Protease Inhibitor Cocktail resuspendiert und 30 min auf Eis lysiert. Die zellulären Bestandteile wurden mittels Zentrifugation bei 13000rpm und 4 °C entfernt und das Proteinlysate in neue Reaktionsgefäße transferiert. Sowohl zu dem anfangs abgenommenen Zellkulturüberstand als auch zum Proteinlysate wurden 5 µg des goat anti-human FIX Antikörpers hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Taumel-Rollenmischer inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurden 100 µl Pierce™ Protein-A/G-Agarose pro Reaktionsgefäß hinzugegeben und für weitere 6 h bei 4 °C rollend inkubiert. Abschließend wurden die *Beads* mit den gebundenen Antikörper-Protein-Komplexen mittels Zentrifugation bei 4 °C und 13000rpm pelletiert und nochmals 3-mal mit IP-Lysepuffer gewaschen. Die Agarose Pellets wurden dann in 2-fachem Laemmli Probenpuffer resuspendiert und der Western Blot wie in Abschnitt 2.9.10 beschrieben durchgeführt.

### 2.9.13 Immunhistochemie

Zur Entnahme der Lebern wurden die vorab betäubten Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach der Entnahme wurde das Gewebe sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in Tissue-Tek® eingebettet. Vom eingebetteten Gewebe wurden 10 µm Schnitte am Kryostaten (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und bis zur weiteren Verwendung bei

-20 °C gelagert. Zur Fixierung der Gewebeschnitte wurden diese zunächst für 10 min bei RT und anschließend für weitere 10 min bei -20 °C mit Aceton behandelt. Zur Reduktion der benötigten Antikörpermengen wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem Super PAP Pen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) umrandet, welcher eine wasserabweisende Oberfläche aufweist. Daraufhin erfolgte eine weitere Fixierung der Gewebeschnitte in 4% Paraformaldehyd für 10 min bei RT. Die Schnitte wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 10 min bei RT mit Methanol behandelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindestellen mittels 3% BSA/0,2% Triton X-100 in PBS für 1 h bei RT. Über Nacht bei 4 °C wurden die Schnitte mit dem FITC-gekoppelten goat anti-human FIX Antikörper (1:1000 in 3% BSA/0,2% Triton X-100 PBS) im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte abermals mit PBS gewaschen und in Vectashield® inklusive DAPI (4'-Diamidin-2-phenylindol) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) eingedeckelt. Die Lagerung bis zur Analyse am konfokalen Lasermikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) erfolgte abgedunkelt bei 4 °C und die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe der ZEN 2.3 lite (blue edition) Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland).

#### 2.9.14 Bestimmung der Thrombogenität

Zur Analyse einer möglicherweise gesteigerten Thrombogenität ausgelöst durch die Hyperaktivität der FIX Varianten wurden zum einen die Konzentration an D-Dimeren und zum anderen die Konzentration an Thrombin-Antithrombin-Komplexen im Plasma gentherapierter Hämophilie B Mäuse bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung der im Plasma enthaltenen D-Dimere erfolgte unter Verwendung des Sta®-Liatest® D-Di Kits der Firma Stago nach Angaben des Herstellers. Das Enzygnost® TAT micro Kit der Firma Siemens wurde nach Angaben des Herstellers zur Konzentrationsbestimmung der Thrombin-Antithrombin-Komplexe in Plasmen gentherapierter Hämophilie B Mäuse verwendet.

## 2.10 Mausexperimente

Alle durchgeführten Tierexperimente wurden an der zentralen Forschungseinrichtung des Universitätsklinikums Frankfurt durchgeführt und waren vorab durch das Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt. Die in den Experimenten verwendeten Mäuse waren ca. 8-12 Wochen alt. Die Tiere wurden bis zu ihrer Verwendung in den Haltungsanlagen der Firma Mfd Diagnostics (Wendelsheim, Deutschland) gezüchtet und versorgt. Erst zu Beginn eines geplanten Tierversuches wurde die entsprechende Anzahl an Tieren in die Zentrale Forschungseinrichtung des Universitätsklinikums Frankfurt transferiert.

### 2.10.1 Mausstamm

Die verwendeten Hämophilie B Mäuse (B6.129P2-F9<sup>tm1DWS</sup>/J) wurden freundlicherweise von K. High (Childrens Hospital of Philadelphia, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt. Die ursprüngliche Mutation im FIX Gen erfolgte im B6.129P2 Stamm durch den Austausch der Exone 1, 2 und 3 gegen eine Neomycin/hprt Minigen Kassetten, wodurch die Transkription vollständig inhibiert wurde und keinerlei FIX mRNA nachgewiesen werden konnte. Die zur Kontrolle benötigten C57Bl/6 Mäuse wurden direkt von der Firma Harlan Laboratories (Rossdorf, Deutschland) bezogen.

### 2.10.2 Retroorbitale Blutentnahme

Aufgrund der verminderten Gerinnung in Hämophilie B Mäusen ist die Gewinnung von Peripherblut nur mittels Punktion des retroorbitalen Plexus möglich. Hierzu wurden die Mäuse durch Isofluran-Inhalationsnarkose kurzfristig betäubt und der retroorbitale Plexus mit Hilfe einer Hämatokritkapillare punktiert. Zur Chelation von im Plasma vorhandenen Kalziumionen wurde das Blut in Reaktionsgefäße mit 1/10 Volumen 3,8%igen Natriumcitrat gesammelt. Das zur Analyse benötigte Plasma wurde von den zellulären Blutbestandteilen mittels Zentrifugation bei 9000 rpm für 15 min bei 4 °C separiert. Mit Ausnahme der unmittelbar zu erfolgenden aPTT Messung konnte das Plasma für weitere Analysen bei -80 °C gelagert werden.

### 2.10.3 *Tail Clip Assay*

Der *Tail Clip Assay* wurde zur Beurteilung der Hämostase in behandelten Hämophilie B Mäusen angewandt. Als Kontrolle dienten hämostatisch unauffällige C57Bl/6 Mäuse, sowie unbehandelte Hämophilie B Mäuse. Vorab wurden die Mäuse mit einem Anästhetikum, bestehend aus 2 mg Ketamin (Pfizer, New York City, USA) und 0,3 mg Rompun narkotisiert und auf den Rand eines auf 42 °C vorgewärmten Wasserbades platziert. Zum Auffangen des Blutes wurden 15 ml Zentrifugationsröhrchen mit 0,9% NaCl befüllt und ebenfalls im Wasserbad für 15 min vorgewärmt. Der Schwanz der Mäuse wurde bei einem Durchmesser von 2,5 mm markiert und ebenfalls für 10 min im Wasserbad vorgewärmt. Nach Ablauf der Zeit wurde mit Hilfe einer Schablone ein 0,5 mm tiefer Schnitt mit einem Skalpell an der lateralen Schwanzvene in Höhe der Markierung durchgeführt und sofort in die vorgewärmte NaCl Lösung getaucht. Die sogenannte primäre Hämostase wurde über einen Zeitraum von 3 min beobachtet. Mäuse, die innerhalb dieser 3 min nicht aufhörten zu bluten, wurden aufgrund möglicher Thrombozyten Defekte aus dem Experiment ausgeschlossen. Das Zentrifugationsröhrchen wurde anschließend gegen ein neues vorgewärmtes ausgetauscht und Blutungen über einen Zeitraum von weiteren 57 min beobachtet. Nach jeweils 15, 30 und 45 min wurde falls erforderlich die verschlossene Wunde mit Hilfe einer nassen Mullbinde und vorsichtigem Reiben geöffnet und die Zeit bis zum erneuten Verschluss der Wunde gemessen. Nach 60 min wurden die immer noch narkotisierten Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und, falls gewünscht, Organentnahmen vorgenommen. Als Messparameter diente zum einen die Gesamtzeit der Blutungen, als auch die verlorene Blutmenge. Hierzu wurden die Zentrifugationsröhrchen für 15 min bei 4 °C und 1400rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet in 6 ml Erythrozyten Lysepuffer resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurden jeweils 100 µl in eine 96-Well Platte pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 575 nm am Victor X4 Spektralphotometer gemessen.

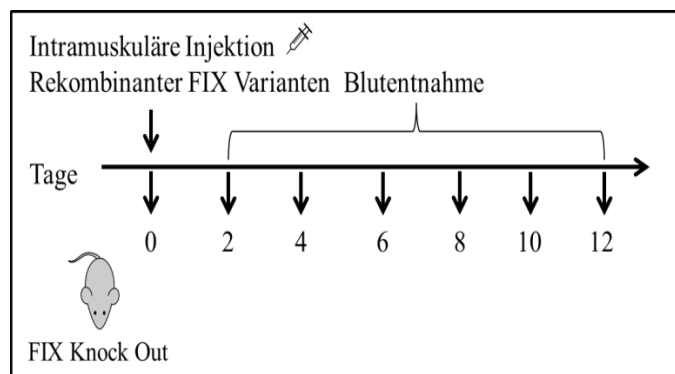


### 2.10.4 Immunogenität der FIX Varianten

Um zu untersuchen, ob die Einführung der Mutationen in das FIX Protein eine Erhöhung der Immunogenität auslöst wurde die Antikörperantwort von Hämophilie B Mäusen auf diese *in vivo* ermittelt. Dies erfolgte in einem ersten Experiment mittels intramuskulärer Injektion der rekombinant hergestellten FIX Proteinvarianten und bei mangelnder Antikörperbildung mittels subkutaner Injektion in Kombination mit dem inkompletten Freundschem Adjuvans, um eine Immunantwort durch hervorgerufene Entzündungsreaktionen zu verstärken.

#### 2.10.4.1 Immunisierung durch intramuskuläre Injektion

Für die intramuskuläre Injektion wurden die FIX Proteinvarianten vorab mittels Anionen-Austausch-Chromatographie aufgereinigt und anschließend 50 µg Protein in den Musculus quadriceps der Mäuse injiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von wildtypischen FIX. Insgesamt wurden pro Bedingung 3-4 Hämophilie B Mäuse behandelt.

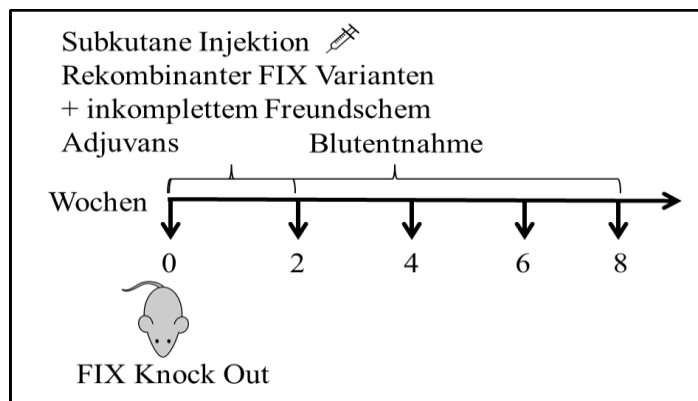


**Abbildung 2.2:** Schema des zeitlichen Ablaufes der Immunisierung durch intramuskuläre Injektion. Den Hämophilie B Mäusen wurden je 50 µg einer rekombinant aufgereinigten FIX Proteinvariante in den *Musculus quadriceps* injiziert. Ab der zweiten Woche post-Injektion wurde den Tieren im zweiwöchigen Abstand Blut entnommen. Als Ausgangswert dient zum Zeitpunkt Null abgenommenes Blut.

Als Referenzwert wurde den Mäusen zum Zeitpunkt Null vor Beginn des Versuches Blut wie unter Abschnitt 2.10.2 beschrieben entnommen. Weitere Blutentnahmen erfolgten dann beginnend mit Woche 2 nach Injektion im zweiwöchigen Abstand. Das gewonnene Plasma wurde bis zur finalen Analyse bei -80 °C gelagert und abschließend auf das Vorhandensein von IgG1 Antikörper gegen FIX mittels FIX IgG1 Antikörper ELISA (siehe Abschnitt 2.9.5) untersucht.

#### 2.10.4.2 Immunogenität der FIX Proteinvarianten in Kombination mit Freundschem Adjuvans

Für die FIX Proteinvarianten, die durch die intramuskuläre Injektion keine Antikörperproduktion induziert hatten, wurde ein weiteres, erheblich sensitiveres Immunisierungsprotokoll durch Kombination von FIX Protein mit inkomplettem Freundschem Adjuvans angewandt (siehe Abbildung 2.3). Hierzu wurden die rekombinant aufgereinigten FIX Proteinvarianten mit inkomplettem Freundschem Adjuvans im Verhältnis 1:1 gemischt und jeweils 20 µg rekombinanter FIX subkutan den Hämophilie B Mäusen appliziert. Die Gruppengröße belief sich auf jeweils 2 Tiere für die wildtypische sowie die BeneFIX® Kontrolle. Bei den FIX Proteinvarianten wurden jeweils 3 Hämophilie B Mäuse injiziert.



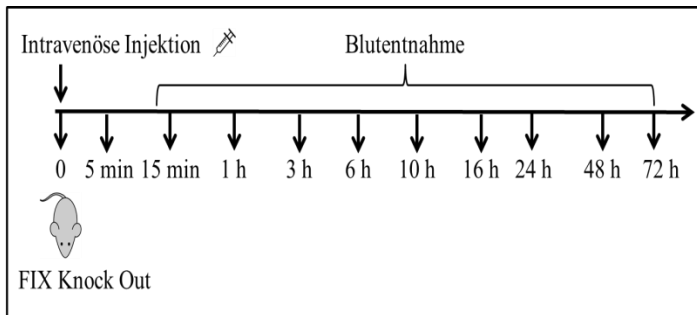
**Abbildung 2.3:** Schema des zeitlichen Ablaufes der subkutanen Injektion von FIX Proteinvarianten inklusive Freundschem Adjuvans. Den Mäusen wurde jeweils 20 µg rekombinantes FIX Protein 1:1 versetzt mit Freundschem Adjuvans subkutan injiziert. Die Injektion wurde nach zwei Wochen wiederholt. Blutentnahmen wurden beginnend mit Woche Null als Referenzwert im zweiwöchigen Abstand vorgenommen.

Die Injektion erfolgte hierbei zweimal in einem Abstand von 2 Wochen. Auch hier wurde den Mäusen ausgehend vom Zeitpunkt Null unmittelbar vor der ersten Injektion im zweiwöchigen Abstand Blut abgenommen und das gewonnene Plasma bei -80 °C gelagert. Die Analyse der sich gebildeten IgG1 Antikörper gegen den FIX erfolgte auch in diesem Teilversuch mittels FIX IgG1 Antikörper ELISA (siehe Abschnitt 2.9.5).

#### 2.10.5 Pharmakokinetik nach intravenöser und subkutaner Injektion

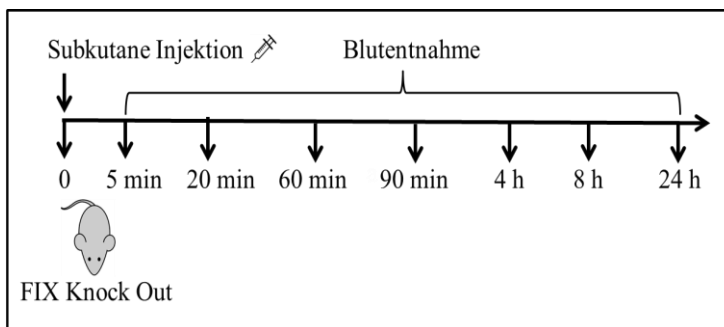
Von besonderem Interesse war auch das pharmakokinetische und pharmakodynamische Verhalten der verschiedenen FIX Varianten, insbesondere der KLV Variante mit der verminderten Bindung an Kollagen Typ IV. Das Verhalten der einzelnen FIX Varianten wurde nach zweierlei Injektionsrouten analysiert. Bei der intravenösen Injektion wurde

den Hämophilie B Mäusen 10 µg rekombinant aufgereinigtes FIX Protein injiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten wie in Abbildung 2.4 zusammengefasst Blut entnommen.



**Abbildung 2.4:** Schema zur Ermittlung der Pharmakokinetik nach intravenöser Injektion von 10 µg rekombinanten FIX Varianten. Als Referenzwert wurde zum Zeitpunkt Null Blut abgenommen. Nach Injektion erfolgten weitere Blutentnahmen nach 5 und 15 min und nach 1,3,6,10,16,24,48 und 72 h.

Das Plasma wurde dann abschließend mittels aPTT und chromogenem Assay auf vorhandene FIX Aktivitäten untersucht (siehe Abschnitt 2.9.6 und 2.9.8) und die vorhandene FIX Antigen Menge mittels FIX ELISA (siehe Abschnitt 2.9.3) bestimmt. Für die subkutane Injektion wurde den Tieren die doppelte Menge, sprich 20 µg rekombinant aufgereinigtes FIX Protein, in die rechte Flanke appliziert. Die Blutentnahmen erfolgten nach dem in Abbildung 2.5 dargestellten zeitlichen Ablauf. Die vorhandene Antigenmenge wurde mittels FIX ELISA (siehe Abschnitt 2.9.3) ermittelt und vorhandene FIX Aktivitäten mit dem aPTT Assay bestimmt (siehe Abschnitt 2.9.6).

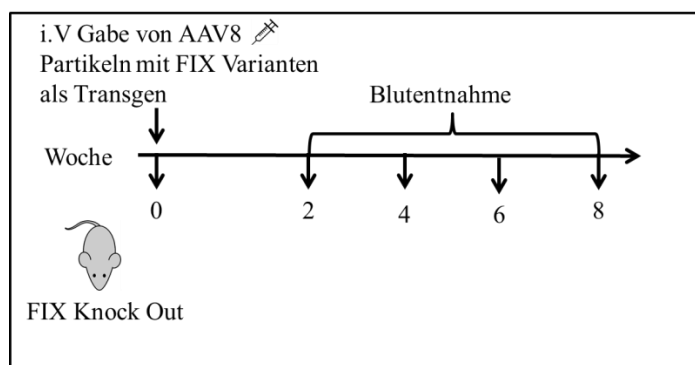


**Abbildung 2.5:** Schema zur Ermittlung der Pharmakokinetik nach subkutaner Injektion von 20 µg rekombinanten FIX Varianten. Als Referenzwert wurde zum Zeitpunkt Null Blut abgenommen. Nach Injektion erfolgten weitere Blutentnahmen nach 5, 20, 60 und 90 min sowie nach 4, 8 und 24 h.

### 2.10.6 AAV Gentherapie von Hämophilie B Mäusen

Neben der Immunogenität und pharmakokinetischen Analysen wurden die FIX Varianten auch abschließend in einer AAV Gentherapie auf ihre Effizienz und Funktionalität hin untersucht. Die hergestellten AAV Partikel des Serotyps 8 mit der jeweiligen FIX Variante als Transgen wurden den Mäusen intravenös in den beiden Dosisstufen  $5 \times 10^{10}$  vg/kg und  $2 \times 10^{11}$  vg/kg appliziert. Ausgehend von Woche Null kurz

bevor der Injektion wurde den Mäusen im zweiwöchigen Abstand Blut entnommen. Das Plasma wurde mittels aPTT (siehe Abschnitt 2.9.6) und chromogenen Assay (siehe Abschnitt 2.9.8) auf FIX Aktivitäten analysiert. FIX Antigenmengen im Plasma wurden mittels FIX ELISA (siehe Abschnitt 2.9.3) ermittelt und das Auftreten von Antikörpern mittels FIX IgG1 Antikörper ELISA (siehe Abschnitt 2.9.5) untersucht. Final erfolgten ein Tail Clip Assay wie unter Abschnitt 2.10.3 beschrieben und anschließend noch die Entnahme der Leber zur Bestimmung der FIX Vektorkopienzahlen mittels qPCR (siehe Abschnitt 2.7.11) sowie für immunhistochemische Färbungen (siehe Abschnitt 2.9.13).



**Abbildung 2.6:** Zeitlicher Ablauf der AAV Gentherapie in Hämophilie B Mäusen. Die AAV8 Partikel mit der jeweiligen FIX Variante als Transgen wurde in den zwei Dosisstufen von  $5 \times 10^{10}$  vg/kg und  $2 \times 10^{11}$  vg/kg untersucht. Nach intravenöser Applikation der AAV8 Partikel erfolgten die Blutentnahmen ausgehend von Woche 2 nach Injektion im zweiwöchigen Abstand.

## 2.11 Statistik

Die statistische Evaluierung der Daten erfolgte mittels der analysis of variance (ANOVA) unter Verwendung des GraphPad Prism Programms in der fünften Version (GraphPad Software, San Diego, USA).

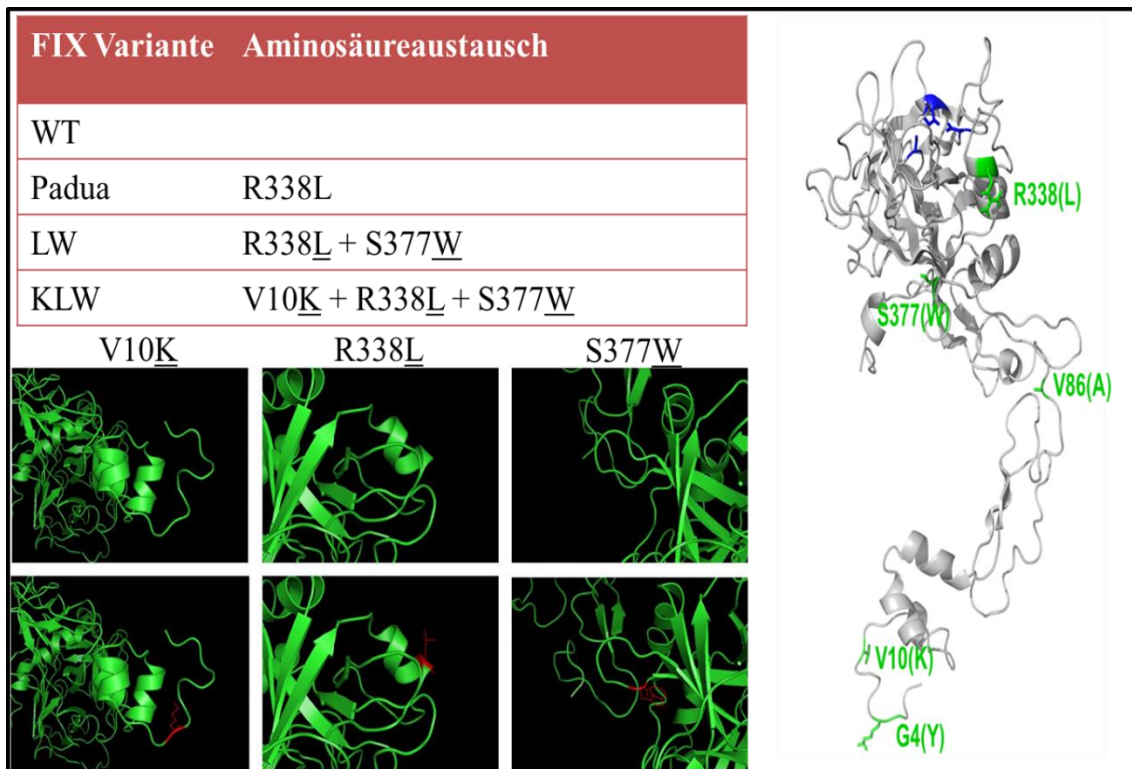


## 3 Ergebnisse

### 3.1 Generierung und Charakterisierung hyperaktiver FIX Varianten *in vitro*

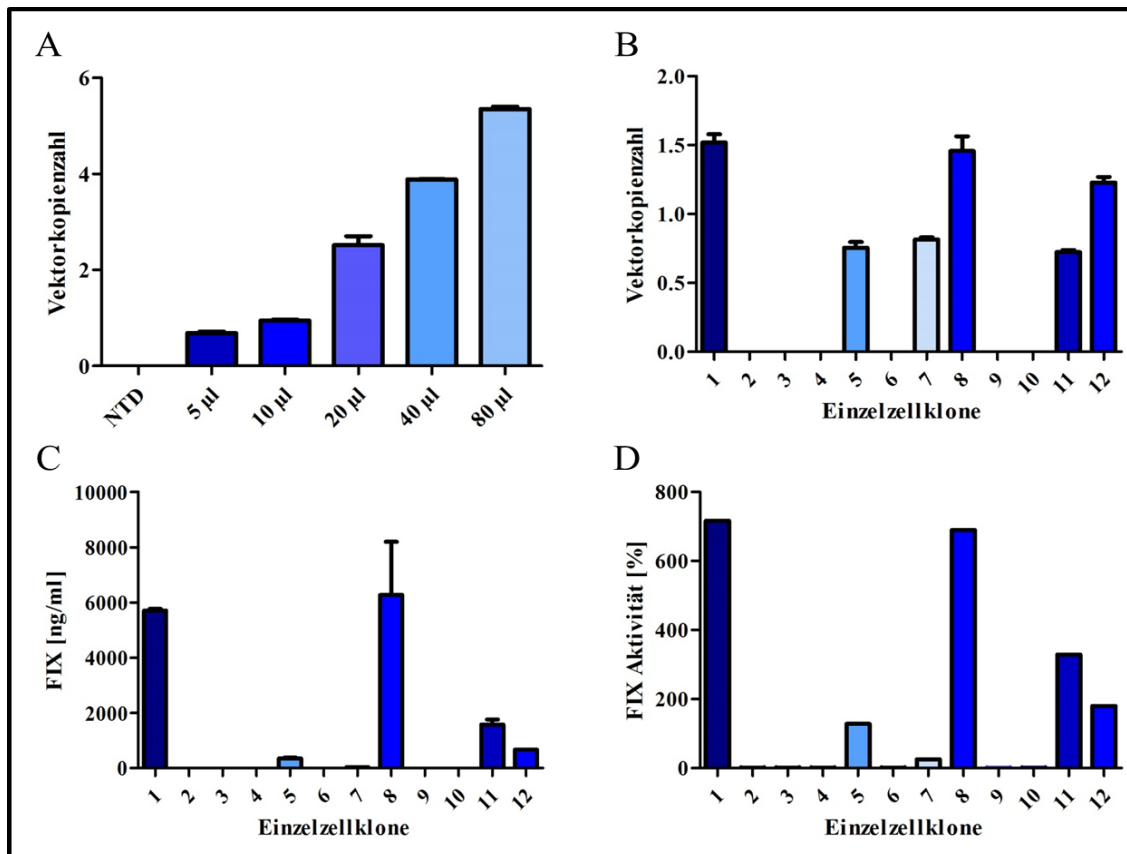
#### 3.1.1 Generierung hyperaktiver FIX Varianten

Der Einsatz von hyperaktivem FIX in der AAV Gentherapie bietet zweierlei Vorteile. Zum einen kann die Reduktion der Vektordosis das Auftreten von Immunreaktionen minimieren, zum anderen kann der zelluläre Stress für die transduzierten Hepatozyten vermindert und trotzdem eine ausreichende hohe FIX Aktivität erzielt werden. So führte die Verwendung einer FIX Variante mit der Padua Mutation in einer AAV Gentherapie Studie der Firma Spark bereits zu einer durchschnittlichen FIX Expression von bis zu 34% und damit zu einer Korrektur hin zu einer milden Verlaufsform der Hämophilie B (69). Aufbauend auf dieser Padua Mutation, charakterisiert durch einen Austausch der Aminosäure Arginin zu Leucin an Position 338, wurden in unserem Labor zwei weitere FIX Varianten entwickelt (siehe Abbildung 3.1). Die LW Variante beinhaltet neben der Padua Mutation einen weiteren Aminosäure Austausch von Serin zu Tryptophan an der Position 377, welche in einer zusätzlichen Steigerung der Aktivität resultierte (171). Die K LW Variante beinhaltet zudem noch einen Austausch der Aminosäure Valin gegen Lysin an Position 10, lokalisiert in der Gla-Domäne. Diese Mutation resultiert in einer verminderten Bindung von FIX an Kollagen Typ IV (30;31), was möglicherweise die *in vivo* Aktivität weiter steigern könnte.



**Abbildung 3.1** Darstellung der Aminosäure Substitutionen zur Generierung der verschiedenen FIX Varianten. Die FIX Varianten wurden aufbauend auf der Padua Variante (R338L) generiert (196). Eine weitere Steigerung der FIX Aktivität wurde durch einen zusätzlichen Aminosäureaustausch von Serin gegen Tryptophan an Position 377 erzielt (171). Ein Austausch der Aminosäure Valin gegen Lysin an Position 10, in der Gla Domäne, führt zu einer verminderten Bindung von FIX an Kollagen Typ IV (30;31).

Zur *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung dieser FIX Proteinvarianten sollten rekombinante Proteine durch Aufreinigung mittels Anionen Austausch Chromatographie hergestellt werden. Aus diesem Grund wurden zunächst HEK293T Zelllinien generiert, welche die jeweilige FIX Proteinvariante stabil exprimieren. Hierzu wurden die entsprechenden Sequenzen der FIX Varianten in einen lentiviralen *Backbone* kloniert (Abschnitt 2.7.9), HEK293T Zellen mit unterschiedlichen Viruspartikeldosen transduziert, Einzelzellklone separiert und anschließend hinsichtlich Vektorkopienzahl und dazu plausiblen (5000 ng FIX WT Antigen entsprechen 100% Aktivität) FIX Antigenmengen und FIX Aktivitäten selektiert (Abschnitt 2.8.3). Die beiden Zelllinien HEK293T/WT und HEK293T/KLW wurden bereits vorab von Frau Dr. Daniela Abriss generiert. In der nachfolgenden Abbildung 3.2 ist exemplarisch die Generierung der HEK293T/LW Zelllinie dargestellt.



**Abbildung 3.2** Die Generierung der Zelllinie HEK293T/LW. (A) HEK293T Zellen wurden vorab mit den entsprechenden lentiviralen Partikeln in unterschiedlichen Mengen transduziert und die Vektorkopienzahl mittels qPCR bestimmt. (B) Ausgehend von den HEK293T/LW Zellen mit durchschnittlich 4 Vektorkopien pro Zelle wurden Einzelzellklone im 96-Well Format ausgesät und nach erfolgreicher Expansion erneut die Vektorkopienzahl bestimmt. Hierbei zeigten sich die beiden Klone 1 und 8 als vielversprechende Kandidaten, welches nach Bestimmung der FIX Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA (C), sowie der gemessenen FIX Aktivität mittels aPTT (D), bestätigt wurde. n=2 für A-C, n=1 für D; MW  $\pm$  SEM.

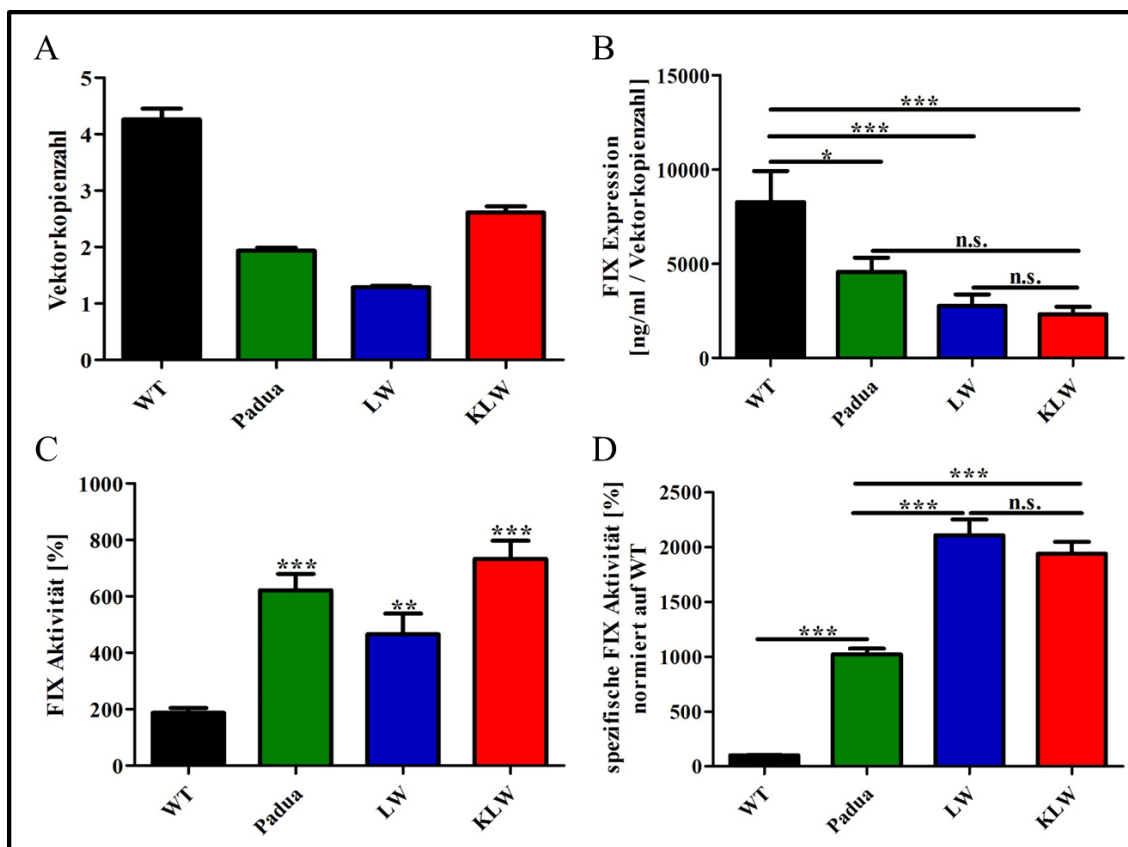
Mit Zunahme der eingesetzten Viruspartikelmenge wurde ein kontinuierlicher Anstieg der Vektorkopienzahlen in der transduzierten Zelllinie HEK293T/LW verzeichnet (Abbildung 3.2 A). Für die Heranzucht der Einzelzellklone wurden diejenigen HEK293T Zellen ausgewählt, welche eine durchschnittliche Vektorkopienzahl von 4 aufwiesen. Hierbei spielt die rein zufällige stöchiometrische Verteilung der Vektorkopienzahl in den einzelnen Zellen eine entscheidende Rolle. Bei ebendieser Vektorkopienzahl treten neben nicht transduzierten Zellen eben auch Zellen mit für die Protein Expression ausreichend hohen Vektorkopienzahlen auf. Zur weiteren Selektion wurden die Zellen dazu auf eine Konzentration von 1,5 Zellen/ml eingestellt und jeweils 200 µl pro Well in eine 96-Well Platte gegeben. Nach erfolgreicher Expansion von 12 HEK293T/LW Klonen wurde abermals die Vektorkopienzahl mittels qPCR bestimmt.



Hierbei zeigten sich die beiden Klone 1 und 8 mit einer Vektorkopienzahl von circa 1,5 als vielversprechende Kandidaten für die Produktion rekombinanter FIX/LW Proteine (Abbildung 3.2 B). Dies konnte auch durch die Ermittlung der FIX Konzentration im Zellkulturüberstand mittels FIX ELISA ( $6484,73 \pm 803,23$  ng/ml) sowie der FIX Aktivität gemessen mittels aPTT ( $703,54 \pm 13,72\%$ ) im Zellkulturüberstand bestätigt werden (Abbildung 3.2 C und D).

In gleicher Weise wurden Einzelzellklone der HEK293T/WT, HEK293T/Padua und HEK293T/KLW Zellen generiert (Daten nicht gezeigt). Ausgewählte Einzelzellklone wurden für einen direkten *in vitro* Vergleich der Vektorkopienzahl, der Protein Expression der FIX Varianten, sowie deren FIX Aktivität im Zellkulturüberstand untersucht. Die Analyse der Vektorkopienzahl der einzelnen FIX Varianten mittels qPCR ergab  $4,26 \pm 0,19$  Kopien/Zelle für den FIX Wildtyp,  $1,93 \pm 0,05$  Kopien/Zelle für die FIX Padua Variante,  $1,29 \pm 0,03$  Kopien/Zelle für die LW Variante und  $2,61 \pm 0,11$  Kopien/Zelle für die KLW Variante (Abbildung 3.3 A). Um die sezernierte Proteinmenge pro Vektorkopienzahl zu bestimmen wurde die jeweilige FIX-Proteinvarianten-Konzentration im Überstand mittels FIX ELISA bestimmt. HEK293T/WT Zellen wiesen eine Expression von  $8269 \pm 1653$  ng/ml pro Vektorkopienzahl auf, wohingegen bei den verschiedenen Varianten eine signifikant verminderte FIX-Protein Expression zu beobachten war (Padua:  $4566 \pm 753$  ng/ml pro Vektorkopienzahl; LW:  $2774 \pm 596$  ng/ml pro Vektorkopienzahl; KLW:  $2320 \pm 399$  ng/ml pro Vektorkopienzahl) (Abbildung 3.3 B). Zur Bestimmung der FIX Aktivitäten wurden die Zellkulturüberstände der HEK293T Varianten mit FIX Mangelplasma im gleichen Verhältnis gemischt und mittels aPTT Assay gemessen. An Hand einer zuvor erstellten Standardgerade aus FIX Mangelplasma und humanem Normalplasma wurde eine FIX Aktivität für das FIX WT Protein von  $187 \pm 17\%$  berechnet. Trotz der beobachteten geringeren Expression zeigten die drei hyperaktiven Varianten eine signifikant erhöhte FIX-Aktivität gegenüber dem Wildtyp (Padua:  $621 \pm 58\%$ ; LW:  $465 \pm 74\%$  und KLW:  $733 \pm 64\%$ ) (Abbildung 3.3 C). Die Berechnung der spezifischen FIX Aktivität, sprich die gemessene FIX Aktivität normalisiert auf die im Zellkulturüberstand enthaltene FIX Konzentration, ergab letztendlich eine tatsächliche Aktivitätssteigerung der Padua Variante ( $1022 \pm 52,6 \%$ ) um circa das 10-fache gegenüber dem FIX Wildtyp ( $100 \pm 3,6\%$ ). Die weitere Aminosäuresubstitution von

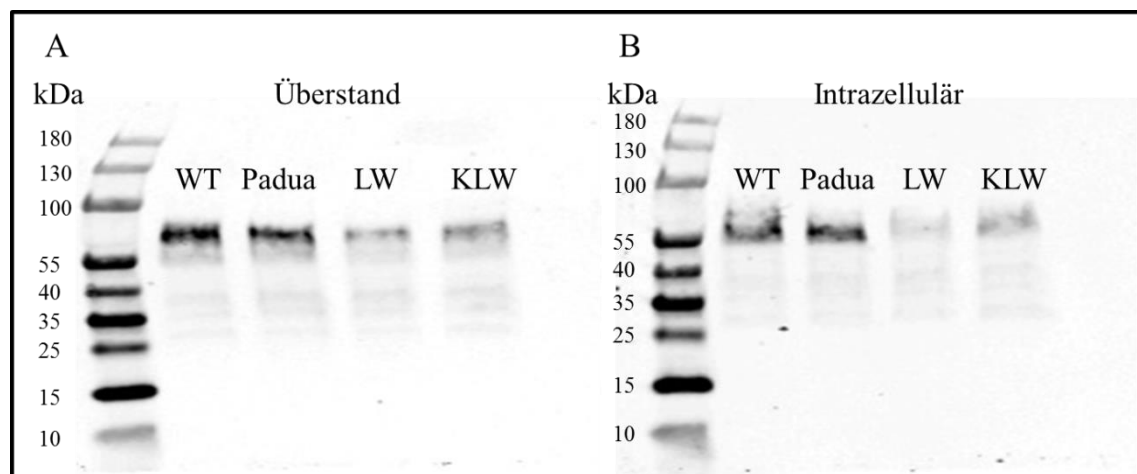
Serin gegen Tryptophan an Position 377 in der LW und K LW Variante führte des Weiteren zu einer Verdopplung der spezifischen Aktivität verglichen mit der Padua Variante (LW:  $2107,4 \pm 144,3\%$ ; K LW:  $1940,8 \pm 106,8\%$ ) und im Vergleich mit dem Wildtyp zu einer 20-fach gesteigerten Aktivität (Abbildung 3.3 D). Für die zusätzliche Aktivitätssteigerung ist nur die Substitution der Aminosäure Serin gegen Tryptophan an Position 377 maßgeblich, wobei die Kollagen Typ IV verminderte Substitution von Valin gegen Lysin an Position 10 keinen Einfluss auf die Aktivität per se ausübt (77). Diese generierten und *in vitro* charakterisierten Zelllinien dienten nun als Grundlage zur Aufreinigung rekombinanter FIX Proteine aus dem Zellkulturüberstand.



**Abbildung 3.3** *In vitro* Charakterisierung und Vergleich der mittels Transduktion generierten Einzelzellklone. (A) Bestimmung der Vektorkopienzahl mittels qPCR. (B) FIX Expression berechnet aus der FIX Konzentration und normiert auf die Vektorkopienzahl. Die mutierten Proteine zeigten allesamt eine geringere Proteinexpression verglichen mit der Wildtyp (WT) Variante (C) Die FIX Aktivität ermittelt mittels aPTT und angegeben in Prozent. Hierbei zeigten die hyperaktiven Varianten eine deutlich gesteigerte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp FIX Protein. (D) Die spezifische Aktivität errechnet sich aus der ermittelten Aktivität normiert auf die FIX Konzentration. Die hyperaktiven FIX Varianten zeigten eine deutlich gesteigerte spezifische Aktivität gegenüber dem Wildtyp, wobei die beiden Varianten LW und K LW nochmals eine weitere Steigerung gegenüber der Padua Variante aufwiesen. n=6, MW  $\pm$  SEM, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; ANOVA, Bonferroni Post-Test.

### 3.1.2 Glykosylierung und Sezernierung der FIX Varianten

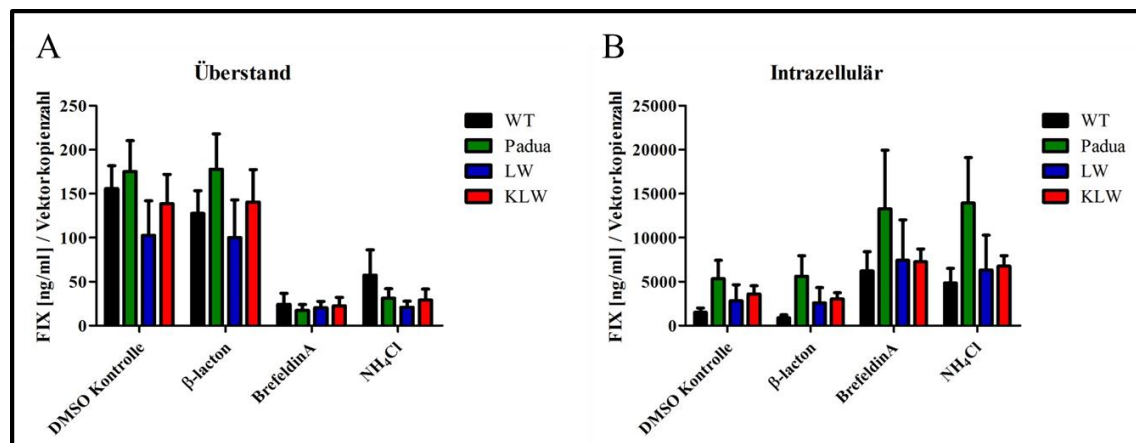
Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben fiel bei der Herstellung der unterschiedlichen FIX Proteine auf, dass die hyperaktiven Varianten Padua, LW und KLW, verglichen mit dem WT FIX Protein in geringeren Konzentrationen in den Zellkulturüberstand sezerniert wurden. Als mögliche Erklärung hierfür wurden eine veränderte Glykosylierung und/oder eine gestörte Sezernierung der hyperaktiven Proteinvarianten angenommen. Der Glykosylierungsstatus der verschiedenen FIX Proteine wurde mittels Western Blot (siehe Abschnitt 2.9.10) analysiert, wobei sich ein potentiell veränderter Glykosylierungsgrad durch einen Größenunterschied bemerkbar machen würde. Hierzu mussten zum einen in den Zellkulturüberstand sezernierte und zum anderen in den Zellen verbliebene FIX-Proteine vorab mittels Immunpräzipitation aufkonzentriert werden (siehe Abschnitt 2.9.12). Wie in Abbildung 3.4 gezeigt konnten weder bei den sezernierten, noch bei den intrazellulären FIX Proteinvarianten Größenunterschiede zum WT Protein detektiert werden, so dass postuliert werden kann, dass alle Varianten quantitativ gleich stark glykosyliert sind. Sezernierte FIX Proteine wiesen hierbei die erwartete Glykoproteingröße von circa 60 kDa auf (Abbildung 3.4 A), während intrazelluläre Proteine, mutmaßlich aufgrund der nicht vollständig abgeschlossenen Glykosylierung im Golgi-Apparat, nur bei circa 55 kDa detektiert werden konnten (Abbildung 3.4 B).



**Abbildung 3.4** Überprüfung der Glykosylierung der verschiedenen FIX Varianten sowohl im Überstand (A), als auch intrazellulär (B). Hierzu wurde vorab eine Immunpräzipitation durchgeführt und anschließend FIX mittels SDS Page und Western Blot detektiert. Zwischen den einzelnen Varianten ist kein Größenunterschied auszumachen, weshalb von einer quantitativ gleichbleibenden Glykosylierung der Proteine ausgegangen werden kann. Exemplarisch wurde ein Western Blot dargestellt.

Zur Analyse inwieweit die Sekretion durch die Mutationen beeinträchtigt sein könnte, wurde die Substanz BrefeldinA eingesetzt, welche den Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum unwandelt. Eine Inhibierung der Proteasomen, welche Aufschluss über eine vermehrte Degradation der mutierten Proteine geben könnte, erfolgte durch die Verwendung der Substanz clasto-Lactacystin  $\beta$ -lacton. Der intrazelluläre Transport hingegen wurde durch eine Erhöhung des lysosomalen pH-Wertes mittels Ammoniumchlorid blockiert. Die HEK293T Zelllinien wurden hierzu in 60 mm Zellkulturplatten ausgesät und mit den oben genannten Substanzen für 6 h behandelt, wobei alle 2 h das Medium, inklusive entsprechender Substanzen, erneuert wurde. Anschließend wurde die intrazelluläre sowie in den Überstand sezernierte FIX Konzentration mittels FIX ELISA bestimmt und auf die Vektorkopienzahl der Einzelzellklone normiert (siehe Abschnitt 2.9.11). Im Überstand (Abbildung 3.5 A) zeigte sich eine deutliche Reduktion der FIX Konzentration nach Inhibierung der Sekretion mittels BrefeldinA, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp mit  $24,37 \pm 12,50$  ng/ml und den drei hyperaktiven Varianten (Padua:  $14,41 \pm 6,24$  ng/ml; LW:  $16,86 \pm 6,85$  ng/ml und KLW:  $22,41 \pm 9,88$  ng/ml) detektiert werden konnten. Ein ähnliches Bild ergab sich nach Inhibierung der Lysosomen, welche ebenfalls mit einer verminderten Sezernierung der FIX Proteine in den Überstand einherging. Aber auch in diesem Fall konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den FIX Varianten beobachtet werden (WT:  $57,30 \pm 28,29$  ng/ml; Padua:  $31,30 \pm 10,71$  ng/ml; LW:  $20,98 \pm 6,83$  ng/ml; KLW:  $28,98 \pm 12,67$  ng/ml). Eine Inhibierung der Proteasomen hingegen zeigte erwartungsgemäß keine intrazelluläre Retention und ebenfalls keinen signifikanten Unterschied weder zur DMSO Kontrolle, noch zwischen den einzelnen Varianten (WT:  $127,51 \pm 25,88$  ng/ml; Padua:  $177,82 \pm 40,20$  ng/ml; LW:  $100,15 \pm 42,97$  ng/ml; KLW:  $140,54 \pm 36,93$  ng/ml). Intrazellulär ergab sich ein konträres Bild (Abbildung 3.5 B) mit einer intrazellulären Anreicherung nach Inhibierung der Sekretion mittels BrefeldinA, wobei auch in diesem Fall keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen FIX Varianten detektiert werden konnten (WT:  $6220,47 \pm 2186,57$  ng/ml; Padua:  $13279,10 \pm 6670,95$  ng/ml; LW:  $7430,08 \pm 4602,52$  ng/ml; KLW:  $7259,13 \pm 1456,49$  ng/ml). Auch die Inhibierung der Lysosomen führte zu einer intrazellulären Retention der FIX Proteinvarianten wobei auch in diesem Fall keine signifikanten Unterschiede untereinander aufgedeckt werden

konnten (WT:  $4848,13 \pm 1662,10$  ng/ml; Padua:  $13955,97 \pm 5160,24$  ng/ml; LW:  $6320,42 \pm 3955,43$  ng/ml; KLW:  $6768,17 \pm 1186,96$  ng/ml). Sollten die FIX Varianten vermehrt über Proteasomen degradiert werden, sollte sich intrazellulär eine Anreicherung nach Inhibierung eben dieser zeigen. Aber auch in diesem Fall konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (WT:  $888,45 \pm 333,45$  ng/ml; Padua:  $5616,16 \pm 2333,24$  ng/ml; LW:  $2592,56 \pm 1735,18$  ng/ml; KLW:  $3026,82 \pm 710,09$  ng/ml). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass der FIX WT sowie die hyperaktiven Varianten gleichermaßen glykosyliert, intrazellulär transportiert und sezerniert werden und die eingefügten Mutationen keinerlei Einfluss auf diese Vorgänge haben.

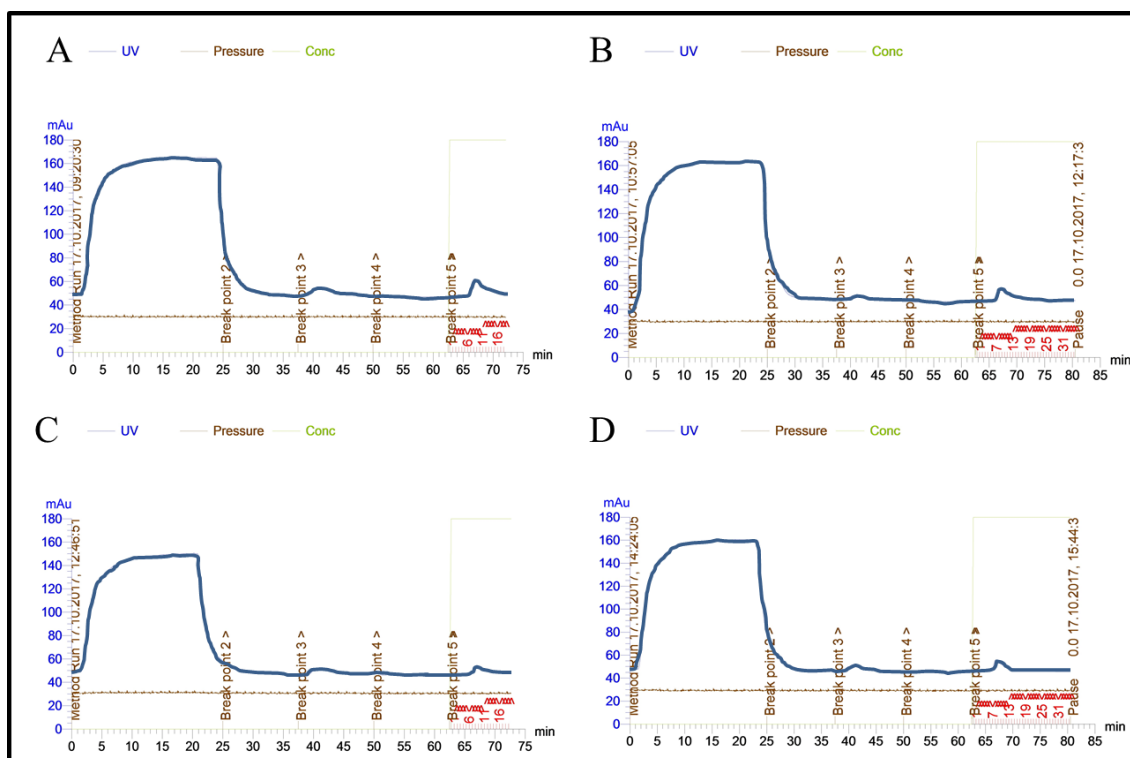


**Abbildung 3.5** Analyse der Sekretion und dem intrazellulären Transport der mutierten FIX Varianten. Hierzu wurden die Proteasomen mittels clasto-Lactacystin  $\beta$ -lacton inhibiert, die Sekretion durch Umwandlung des Golgi-Apparates zum Endoplasmatischen Retikulum mit BrefeldinA verhindert, sowie der lysosomale Transport durch Erhöhung des pH-Wertes mittels Ammoniumchlorid inhibiert. (A) Hierbei zeigten sich weder im Überstand, sprich bei der direkten Sekretion, Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten, (B) noch im intrazellulären Transport.  $n=6$ ,  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ , ANOVA, Bonferroni Post-Test.

### 3.1.3 Aufreinigung der FIX Varianten

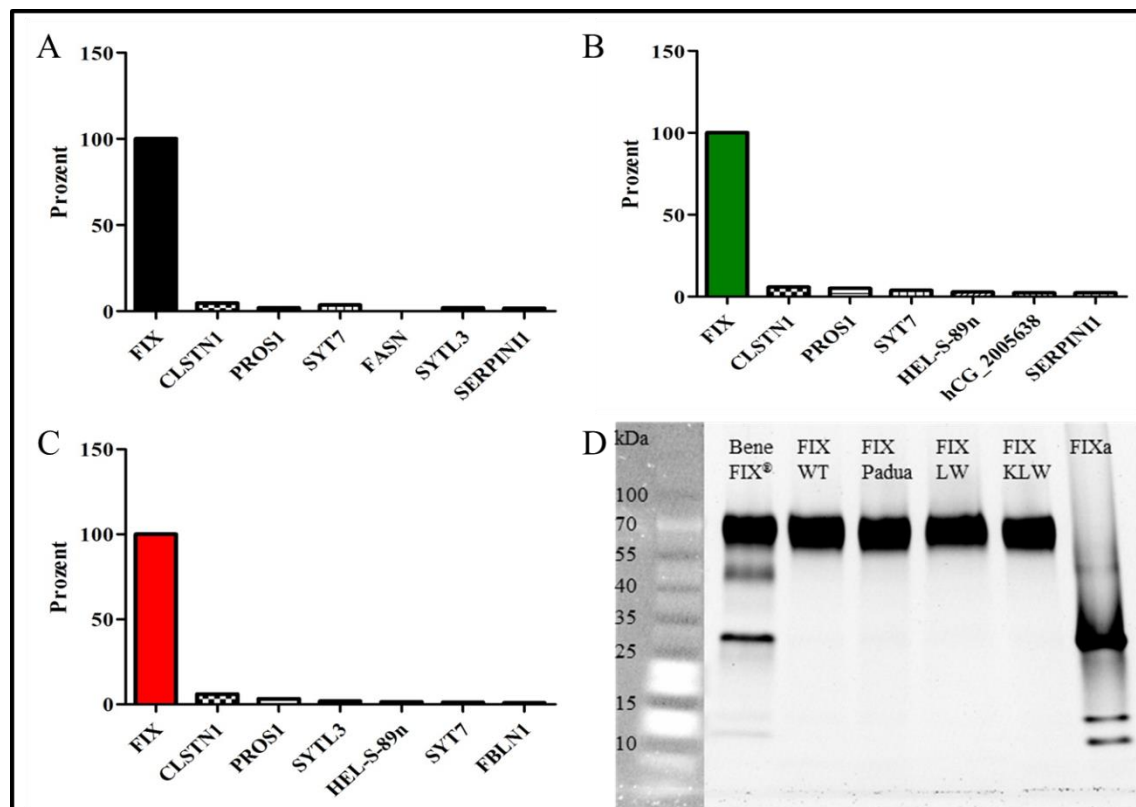
Die Aufreinigung der rekombinanten FIX Varianten erfolgte aus dem Zellkulturüberstand der zuvor generierten und charakterisierten HEK293T/WT, HEK293T/Padua, HEK293T/LW und HEK293T/KLW Zelllinien mittels Anionen Austausch Chromatographie (siehe Abschnitt 2.9.1). Der Verlauf des Aufreinigungsprozesses der verschiedenen FIX Proteinvarianten konnte anhand der Chromatogramme nachvollzogen werden. Im ersten Schritt wurde der zuvor gegen A0 Puffer dialysierte Zellkulturüberstand auf die HiTrap Q FF Sepharose Säule (GE

Healthcare, Chicago, USA) geladen. Die negativ geladenen FIX Proteinvarianten wurden von den stark positiv geladenen quartären Ammoniumverbindungen der HiTrap Q FF Sepharose Säule gebunden, während andere Proteine aus den Überständen ungebunden durch die Säule gewandert sind und in Folge dessen vom UV-Detektor erkannt wurden. Die nachfolgenden beiden Waschschrte mit den beiden Puffern A1 und A2 dienten nochmals zur Entfernung von Verunreinigungen und folglich zur Erhöhung der Reinheit der FIX Protein Ausbeute. Die Elution der zuvor gebundenen FIX Proteinvarianten wurde durch eine Erhöhung der Salzkonzentration und der damit einhergehenden Verdrängung des FIX Proteins von den Ammoniumverbindungen erzielt. Kennzeichnend wurde die Elution ebenfalls über den Ausschlag des UV Detektors. Anhand des UV Ausschlages konnten die Fraktionen 7-14 als FIX Protein beinhaltend identifiziert, vereinigt und über Nacht gegen 5 Liter A1 Puffer dialysiert werden. Zur Erhöhung der Proteinkonzentration wurde abschließend eine Aufkonzentration vorgenommen (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6** Chromatogramme aufgezeichnet während der Anionen-Austausch-Chromatographie zur Aufreinigung der rekombinanten FIX Varianten WT (A), Padua (B), LW (C), und K LW (D). Die blaue Linie stellt hierbei die photometrische Detektion von Proteinen bei 280 nm dar. Die Elution fand bei allen Varianten in den Fraktionen 7-14 nach Erhöhung der Salzkonzentration statt, welche schließlich vereinigt und aufkonzentriert wurden. Dargestellt wurde je ein exemplarisches Chromatogramm pro FIX Variante.

Die Reinheit der rekombinant aufgereinigten Proteine wurde zum einen mittels SDS Page und zum anderen mittels Massenspektroskopie bestimmt. Die Massenspektroskopie wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof Dr. med. Thomas Öllerich durchgeführt. Die massenspektroskopischen Analysen ergaben, dass die dialysierten Eluatfraktionen neben der entsprechenden FIX Variante weniger als 1% verunreinigender anderer Proteine enthielten (Abbildung 3.7 (A) WT, (B) Padua und (C) KLW). Darüber hinaus wurden kleinere Peptidfragmente von weiteren Proteinen identifiziert. Hierzu gehörte unter anderem Calsyntenin (CLSTN1), welches ein Kalzium-bindendes Transmembranprotein ist (208) und möglicherweise während der Elution an die vorhandenen Kalzium-Ionen im B1 Puffer binden konnte.



**Abbildung 3.7** Bestimmung des Reinheitsgrades der Aufreinigung mittels Massenspektroskopie sowie SDS Page. Die massenspektroskopischen Analysen der aufgereinigten FIX Varianten wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Oellerich durchgeführt. Die Analysen zeigen, dass es möglich war, mittels Anionen-Austausch-Chromatographie >99% reinen FIX aufzureinigen. (D) Die Reinheit konnte darüber hinaus noch in der SDS Gelelektrophorese bestätigt werden. n=1

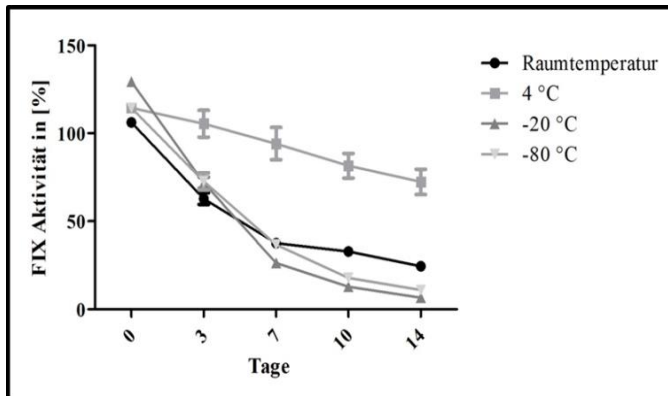
Darüber hinaus wurden auch Peptidfragmente von Protein S (PROS1) nachgewiesen. Protein S fungiert als Kofaktor von Protein C, dessen Funktion in der Proteolyse von

aktiviertem FVa und FVIIIa besteht (25). Detektiert werden konnten auch Peptidfragmente der Fettsäure Synthase (FASN) welche insbesondere in Tumorzelllinien, wie HEK293T Zellen, überexprimiert vorliegt und die Bildung von Palmitinsäure im Zuge der Lipogenese katalysiert (92). Zudem wurden Peptidfragmente von Synaptotagmin-like Protein 3 (SYTL3) erkannt, welches eine Rolle im Vesikeltransport spielt und zudem in Anwesenheit von Kalzium an Phospholipide bindet (62). Zur weiteren Analyse der Reinheit der Proteine wurde jeweils 5 µg rekombinant aufgereinigter FIX auf einem SDS-Gel aufgetragen und mittels SYPRO™ Ruby Protein Gel Stain Kit die Proteinbanden sichtbar gemacht (siehe Abschnitt 2.9.9). Als Referenz wurde zum einen BeneFIX® als kommerziell erhältlicher FIX und bereits voraktivierter FIXa verwendet. Wie erwartet, wiesen alle FIX Proteinvarianten eine Größe von circa 60 kDa auf und es waren weder beim Wildtyp noch bei den Varianten zusätzliche Proteinbanden erkennbar, was ebenfalls den hohen Reinheitsgrad der Aufreinigung unterstreicht. Lediglich bei dem kommerziell erhältlichen BeneFIX® konnten zusätzliche Proteinbanden auf Höhe der schweren, beziehungsweise leichten Kette von FIX detektiert werden, weswegen von einer teilweise vorliegenden Voraktivierung ausgegangen werden kann (Abbildung 3.7 D).

Die Aufreinigung der rekombinanten FIX Proteinvarianten erwies sich als sehr effektiv, sodass insbesondere beim FIX WT pro Aufreinigungsvorgang bis zu 800 µg hoch reines FIX Protein gewonnen wurde. Aus diesem Grund wurden auch unterschiedliche Lagerungsbedingungen mit Erhaltung der Funktionalität der aufgereinigten FIX Proteine analysiert. Hierzu wurde der rekombinante FIX Wildtyp auf eine Konzentration von 5 µg/ml, sprich 100% FIX Aktivität, in A1 Puffer eingestellt. Die Lagerung erfolgte vergleichend bei Raumtemperatur, 4 °C, -20 °C und -80 °C und die jeweils verbliebene FIX Aktivität wurde nach 3, 7, 10 und 14 Tagen mittels aPTT Assay ermittelt (Abbildung 3.8). Die Lagerung bei Raumtemperatur, -20 °C sowie -80 °C führte zu einem raschen Verlust der anfänglich gemessenen Aktivität von  $116,09 \pm 2,16\%$ . Bereits am dritten Tag konnten unter diesen Lagerbedingungen nur noch  $69,13 \pm 2,41\%$  FIX Aktivität nachgewiesen werden. Deutlich besser verhielt es sich mit der Lagerung der aufgereinigten FIX WT Proteine bei 4 °C. Am dritten Tag konnte unter diesen Bedingungen noch eine FIX Aktivität von  $105,44 \pm 4,43\%$  mittels aPTT Assay gemessen werden, so dass eine Lagerung von bis zu drei Tagen bei 4 °C möglich war.



Eine andere Möglichkeit für eine langfristige Lagerung wäre die Gefriertrocknung der aufgereinigten Proteine gewesen, dies konnte allerdings aufgrund fehlender Geräte nicht durchgeführt werden.

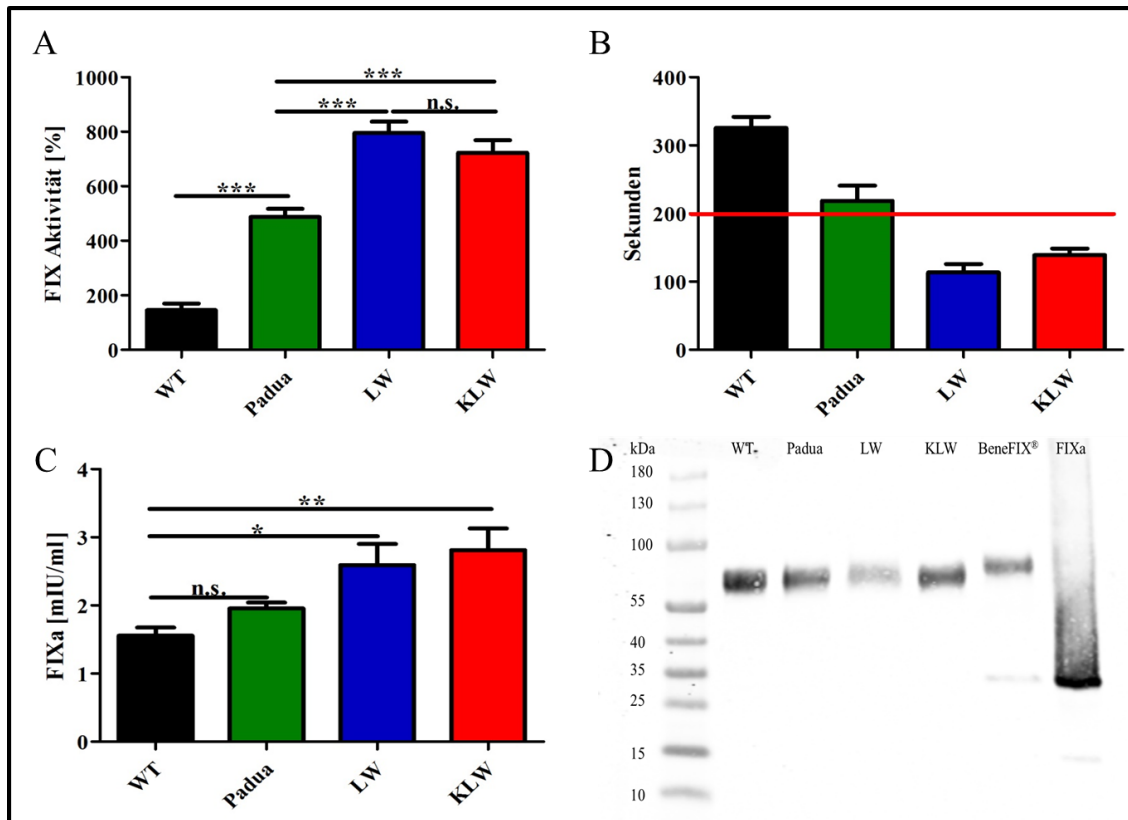


**Abbildung 3.8** Vergleich der Lagerungsbedingungen der aufgereinigten FIX Varianten. Diese wurden vorab auf eine Konzentration von 5 µg/ml eingestellt und bei Raumtemperatur, 4 °C, -20 °C und -80 °C gelagert. Nach 3, 7, 10 und 14 Tagen wurde die verbliebene FIX Aktivität mittels aPTT Assay bestimmt. Hierbei erwies sich eine Lagerung von 3 Tagen bei 4 °C als praktikabel. n=4, MW ± SEM.

### 3.1.4 Funktionalität der aufgereinigten FIX Varianten

Da die aufgereinigten FIX Varianten *in vivo* pharmakokinetisch charakterisiert werden sollten, ist neben dem Reinheitsgrad der aufgereinigten Proteine auch deren Funktionalität von entscheidender Bedeutung. Zur Untersuchung der Funktionalität wurden die FIX Varianten in einer Konzentration von 5 µg/ml im aPTT Assay untersucht (siehe Abschnitt 2.9.6). Hierbei zeigte der FIX Wildtyp eine Aktivität von  $78,0 \pm 3,6\%$ , wohingegen die FIX Padua Proteinvariante eine Aktivitätssteigerung auf  $388,3 \pm 27\%$  aufwies. Die beiden anderen Varianten, LW und K LW, zeigten eine weitere Steigerung der FIX Aktivität auf  $545,1 \pm 33,0\%$  beziehungsweise  $611,0 \pm 44,2\%$  (Abbildung 3.9 A). Dies entspricht einer 5-fachen Erhöhung bei der Padua Variante und einer 7- bis 8-fachen Aktivitätssteigerung für die LW beziehungsweise K LW Variante gegenüber dem FIX Wildtyp. Neben der Aktivitätsbestimmung wurde auch ein naPTT Assay (siehe Abschnitt 2.9.7) durchgeführt, um eine eventuelle Voraktivierung des FIX, verursacht durch den Aufreinigungsprozess, zu identifizieren. Als Normwert wird ein Sekundenbereich zwischen 200 und 350 Sekunden angegeben (156), und bei Unterschreiten dieses Wertes muss von einer Voraktivierung ausgegangen werden. Im Fall vom FIX WT Protein lag dieser Bereich deutlich oberhalb dieses Schwellenwertes ( $325,4 \pm 16,5$  Sekunden), wohingegen die Padua Variante diesen Bereich mit  $218,4 \pm 22,4$  Sekunden nur knapp überschritt. Die beiden FIX Varianten LW ( $113,6 \pm 12,3$

Sekunden) und KLW ( $138,8 \pm 9,6$  Sekunden) hingegen lagen deutlich unterhalb des Schwellenwertes von 200 Sekunden, weswegen zu diesem Zeitpunkt und unter Verwendung des naPTT Assay eine Voraktivierung der aufgereinigten FIX LW und KLW Proteinvarianten nachgewiesen wurde (Abbildung 3.9 B).



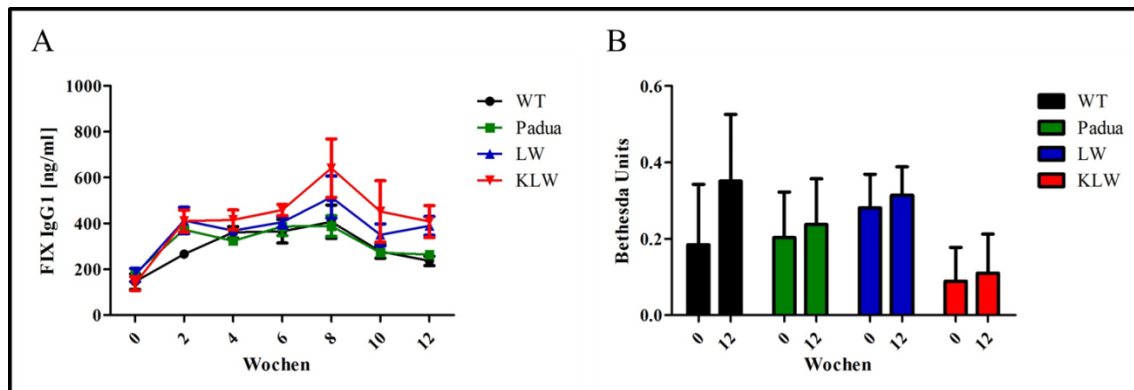
**Abbildung 3.9** Die Überprüfung der Funktionalität der rekombinanten FIX Varianten erfolgte durch Aktivitätsbestimmung von 5 µg/ml aufgereinigtem FIX Protein. (A) Im aPTT Assay zeigte sich die zu erwartende Aktivität von ca. 78% beim Wildtyp, während eine Zunahme der Aktivität hin zur Padua Variante und weiter zur LW und KLW Variante zu beobachten war. (B) Bei der Verwendung des naPTT Reagenzes hingegen zeigten die LW und die KLW Proteine eine Unterschreitung des Schwellenwertes von 200 Sekunden, welches ein Indiz für eine mögliche Voraktivierung sein könnte. (C) Die Überprüfung auf das Vorhandensein von aktiviertem FIXa mittels chromogenem Assay hingegen ergab eine maximale Konzentration von 3 mIU/ml, sprich maximal 0,3% waren voraktiviert (D) Dies wurde auch im Western Blot bestätigt. Mit Ausnahme des kommerziell erhältlichen BeneFIX® zeigte keine der aufgereinigten FIX Varianten eine zusätzliche Proteinbande bei 35 kDa. Folglich konnte im Western Blot weder beim FIX Wildtyp noch bei den rekombinant aufgereinigten FIX Varianten voraktivierter FIXa nachgewiesen werden. n=4, MW  $\pm$  SEM, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; ANOVA, Bonferroni Post-Test.

Um den Verdacht des Vorhandenseins voraktivierten FIXa Proteins genauer zu untersuchen wurde ein chromogener Assay (siehe Abschnitt 2.9.8) durchgeführt. Die errechnete Konzentration an voraktiviertem Protein beim aufgereinigten FIX WT betrug  $1,6 \pm 0,1$  mIU/ml und bei der Padua Variante  $2,0 \pm 0,1$  mIU/ml. Eine leicht signifikante Erhöhung der Konzentration an voraktiviertem FIX erfolgte bei der LW Variante

verglichen mit dem WT ( $2,6 \pm 0,3$  mIU/ml). Eine zusätzliche tendenzielle Erhöhung konnte bei der K LW Variante beobachtet werden ( $2,8 \pm 0,3$  mIU/ml) (Abbildung 3.9 C). Genauer betrachtet bedeutet dies allerdings nur einen maximal 0,28%igen Anteil an voraktiviertem FIX in 100% aufgereinigtem Protein, was für die weiteren Experimente als vernachlässigbar angesehen wurde. Dies wurde darüber hinaus nochmals im Western Blot bestätigt. Aufgetragen wurden je 5 µg rekombinantes FIX Protein zusammen mit BeneFIX® und bereits voraktiviertem FIX als Kontrolle. Die bei der Aktivierung von FIX entstandene schwere Kette wies hierbei eine Größe von 35 kDa auf und die leichte Kette verlief bei etwa 15 kDa. Mit Ausnahme des kommerziell erhältlichen BeneFIX® wurde weder beim aufgereinigten Wildtyp, noch bei den hyperaktiven Varianten eine Bande entsprechend der Größe der schweren beziehungsweise leichten Kette vom aktivierten FIXa nachgewiesen (Abbildung 3.9 D). Zusammenfassend zeigen die Daten, dass mittels Anionen-Austausch-Chromatographie hoch reiner und zudem funktioneller FIX aufgereinigt werden konnte und die Varianten somit für die nachfolgenden *in vivo* Experimente zur Verfügung standen.

### 3.2 Immunogenes Potential der FIX Varianten

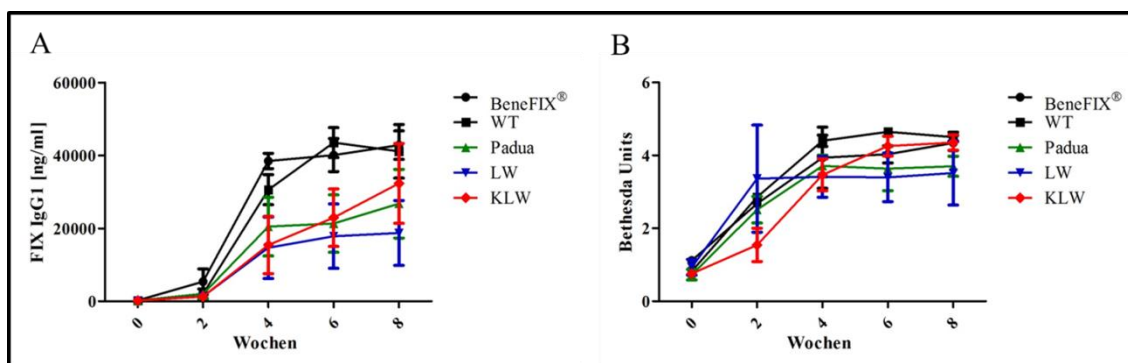
Die Einführung von Mutationen in das FIX Protein könnte eine Erhöhung der Immunogenität zur Folge haben (207). Diese Hypothese wurde daher in zwei verschiedenen Experimenten untersucht. Im ersten Experiment wurden Hämophilie B Mäusen (B6.129P2-F9<sup>tm1DWS</sup>/J) 50 µg rekombinant aufgereinigtes Protein in den *Musculus quadriceps* injiziert und im zweiwöchigen Abstand retroorbital Blut entnommen (siehe Abschnitt 2.10.4.1). Das Plasma wurde daraufhin zum einen mittels IgG1 Antikörper ELISA auf das Vorhandensein von FIX Antikörpern hin untersucht (siehe Abschnitt 2.9.5) und zum anderen mittels Bethesda Assay der Anteil an inhibitorischen Antikörpern ermittelt. Hierbei gelten Bethesda Units (BU) < 1 als negativ für inhibitorische Antikörper, < 5 als niedrig-titrige und > 5 als hoch-titrige inhibitorische Antikörper (101). Die Ermittlung der FIX IgG1 Antikörper Konzentration im Mausplasma ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem FIX Wildtyp Protein und den hyperaktiven Varianten. Insgesamt schwankte die Antikörper Konzentration nach Injektion von FIX WT Protein über den gemessenen Zeitraum im Mittel um  $294,56 \pm 33,98$  ng/ml FIX IgG1 Antikörper. Bei der Padua Variante wurde im Mittel eine IgG1 Konzentration von  $213,33 \pm 29,25$  ng/ml gemessen, bei der LW Variante  $373,71 \pm 38,66$  ng/ml und bei der K LW Variante  $417,67 \pm 56,00$  ng/ml (Abbildung 3.10 A). Alle gemessenen Antikörper Konzentrationen lagen in einem immunologisch irrelevanten Bereich, der erst ab vierstelligen Antikörper Konzentrationen beginnt. Dies zeigte sich auch in der Analyse der inhibitorischen Antikörper mittels Bethesda Assay. Alle untersuchten Proben lagen im negativen Bereich für inhibitorische Antikörper. Nach Injektion des Wildtyp Proteins konnte ein Wert von durchschnittlich  $0,26 \pm 0,12$  Bethesda Units (BU) ermittelt werden. Ähnliche Werte ergaben sich nach Injektion der hyperaktiven Varianten (Padua:  $0,22 \pm 0,08$  BU; LW:  $0,30 \pm 0,05$  BU und K LW:  $0,10 \pm 0,06$  BU) (Abbildung 3.10 B). Inhibitorische Antikörper werden also weder vom FIX WT, noch von einer der hyperaktiven FIX Proteinvarianten in diesem experimentellen Ansatz induziert.



**Abbildung 3.10** Bestimmung der Immunogenität der mutierten FIX Proteine nach intramuskulärer Injektion rekombinanter Proteine. Hämophilie B Mäusen (B6.129P2-F9<sup>tm1DWS</sup>/J) wurden 50 µg aufgereinigter FIX in den *Musculus quadriceps* injiziert. Beginnend in Woche Null erfolgten retroorbitale Blutentnahmen im Abstand von zwei Wochen. (A) Das so gewonnene Plasma wurde mittels IgG1 FIX ELISA auf das Vorhandensein von IgG1 Antikörpern gegen FIX hin untersucht. Hierbei zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen FIX Varianten. (B) Dies spiegelte sich auch in der Analyse von inhibitorischen Antikörpern mittels Bethesda Units wider. Die Werte lagen allesamt im irrelevanten Bereich von < 1 Bethesda Units. n=4 für WT; n=3 für Padua, LW und KLW, MW ± SEM, ANOVA, Bonferroni Post-Test.

Um gezielter eine Aussage über eine mögliche Steigerung der Immunogenität treffen zu können musste ein zusätzliches Experiment mit einer tatsächlichen Induktion von inhibitorischen Antikörpern durchgeführt werden. Erst dadurch können Vergleiche zwischen den verschiedenen FIX Varianten gezogen werden. Daher wurden in einem zweiten Experiment 10 µg rekombinantes FIX Protein in Kombination mit inkomplettem Freundschens Adjuvans Hämophilie B Mäusen (B6.129P2-F9<sup>tm1DWS</sup>/J) subkutan injiziert. Die Verwendung dieser Substanz ruft subkutan eine Entzündungsreaktion hervor, wodurch immunologische Zellen zur Injektionsstelle rekrutiert werden (93). Da sich nun ebenfalls das injizierte FIX Protein in diesem Gebiet befindet, richtet sich auch hiergegen eine immunologische Antwort. Die Injektion wurde nach 2 Wochen einmalig wiederholt und die Bildung von IgG1 Antikörper im zweiwöchigen Abstand mittels IgG1 Antikörper ELISA bestimmt (siehe Abschnitt 2.10.4.2). Beginnend in Woche Null als Referenzwert wurde über den gesamten Zeitraum ein Anstieg der Antikörperkonzentrationen im Mausplasma verzeichnet. Die IgG1 Konzentrationen stiegen bei Gabe von BeneFIX<sup>®</sup> von anfänglich 239,22 ± 5,09 ng/ml auf bis zu 42817,94 ± 3906,92 ng/ml an. Ähnlich verhielt es sich bei der Injektion von rekombinantem FIX WT welcher ausgehend von 177,07 ± 33,67 ng/ml auf 41117,14 ± 7342,55 ng/ml anstieg. Die aufgereinigten hyperaktiven Varianten zeigten zwar tendenziell einen geringeren Anstieg der IgG1 Konzentrationen, dies konnte

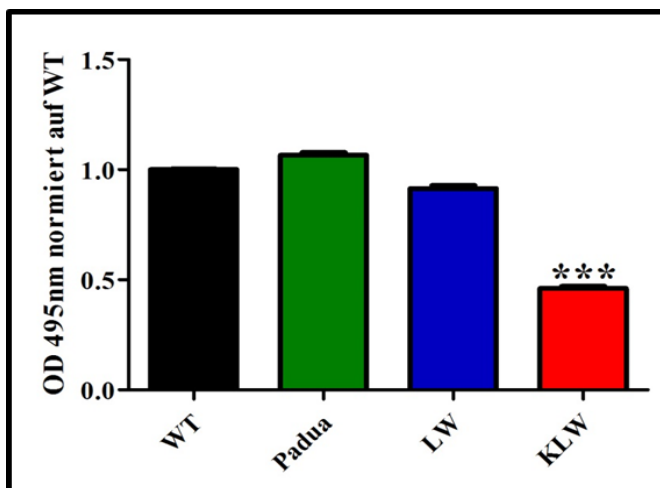
allerdings als statistisch nicht signifikant belegt werden (Padua:  $26759,31 \pm 9418,19$  ng/ml; LW:  $18745,51 \pm 8903,53$  ng/ml; K LW:  $32328,62 \pm 10936,57$  ng/ml) (Abbildung 3.11 A). Die deutliche Immunisierung der Hämophilie B Mäuse spiegelte sich auch in den ermittelten Bethesda Units wider (Abbildung 3.11 B). Es konnte ebenfalls ein Anstieg über den Zeitraum von 8 Wochen beobachtet werden, allerdings ohne einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen BeneFIX<sup>®</sup>, dem FIX WT, sowie den hyperaktiven Varianten. So stiegen die BU nach Injektion von BeneFIX<sup>®</sup> von  $1,12 \pm 0,03$  BU auf  $4,34 \pm 0,20$  BU und beim selbst aufgereinigtem FIX WT Protein von  $0,82 \pm 0,08$  BU auf  $4,50 \pm 0,13$  BU an. Ein ähnlicher Anstieg der Bethesda Units vom nicht relevanten Bereich bis sogar hin zum hoch-titrigen Bereich konnte auch bei allen hyperaktiven Varianten beobachtet werden (Padua: von  $0,73 \pm 0,14$  BU auf  $3,70 \pm 0,27$  BU; LW: von  $0,93 \pm 0,21$  BU auf  $3,52 \pm 0,88$  BU und K LW von  $0,76 \pm 0,02$  BU auf  $4,35 \pm 0,21$  BU). Zusammenfassend lässt sich somit ausschließen, dass die eingeführten Mutationen die Immunogenität des FIX Proteins signifikant beeinflussen.



**Abbildung 3.11** Bestimmung der Immunogenität der mutierten FIX Proteine nach subkutaner Injektion rekombinanter Proteine in Kombination mit dem Freundschens Adjuvans. Hämophilie B Mäuse wurden mit  $10 \mu\text{g}$  der jeweiligen FIX Variante zusammen mit inkomplettem Freundschem Adjuvans im gleichen Verhältnis subkutan injiziert. Im Abstand von zwei Wochen wurden über einen Zeitraum von acht Wochen retroorbital Blut entnommen und das Plasma auf das Vorhandensein von IgG1 Antikörpern gegen FIX (A) und inhibitorischen Antikörpern mittels Bethesda Assay untersucht (B). In Kombination mit dem Adjuvans ist ein klarer Anstieg an IgG1 Antikörper Konzentrationen im Mausplasma gegen FIX erkennbar, allerdings ohne signifikanten Unterschied zwischen BeneFIX<sup>®</sup>, FIX WT und den einzelnen Varianten. Ähnlich verhielt es sich mit den Bethesda Units, welche im Wochenüberblick einen Anstieg zeigten, allerdings ebenfalls ohne signifikanten Unterschied.  $n=2$  für BeneFIX<sup>®</sup> und WT;  $n=3$  für Padua, LW und K LW, MW  $\pm$  SEM, ANOVA, Bonferroni Post-Test.

### 3.3 Einfluss der verminderten Kollagen Typ IV Bindung auf die Pharmakokinetik der FIX K LW Variante

Die FIX K LW Variante zeichnet sich neben der gesteigerten Aktivität noch durch eine verminderte Bindung an das extrazelluläre Matrix Molekül Kollagen Typ IV aus. Hervorgerufen wird dieser Effekt durch den Austausch der Aminosäure Valin gegen Lysin an Position 10, lokalisiert in der Gla Domäne des FIX Proteins (30;31). Zur Überprüfung, ob es sich mit dem in dieser Arbeit hergestellten K LW Protein ebenso verhält, wurde ein Kollagen Typ IV Bindungs Assay durchgeführt. Hierzu wurden 10 µg der rekombinant aufgereinigten FIX Varianten auf mit Kollagen Typ IV beschichteten 96-Well Platten inkubiert und die gebundenen FIX Proteine photometrisch detektiert (siehe Abschnitt 2.9.4).



**Abbildung 3.12** Affinitätsanalyse der aufgereinigten FIX Varianten zum extrazellulären Matrix Molekül Kollagen Typ IV. Die Bindung der einzelnen FIX Varianten wurde in einem Kollagen Typ IV *solid phase Binding* Assay untersucht. Die K LW Variante zeigte hierbei wie erwartet eine deutliche Reduktion der Kollagen Typ IV Bindung verglichen mit dem WT, sowie der Padua und LW Variante. n=3, MW ± SEM, \*\*\*p < 0,001; ANOVA, Bonferroni Post-Test.

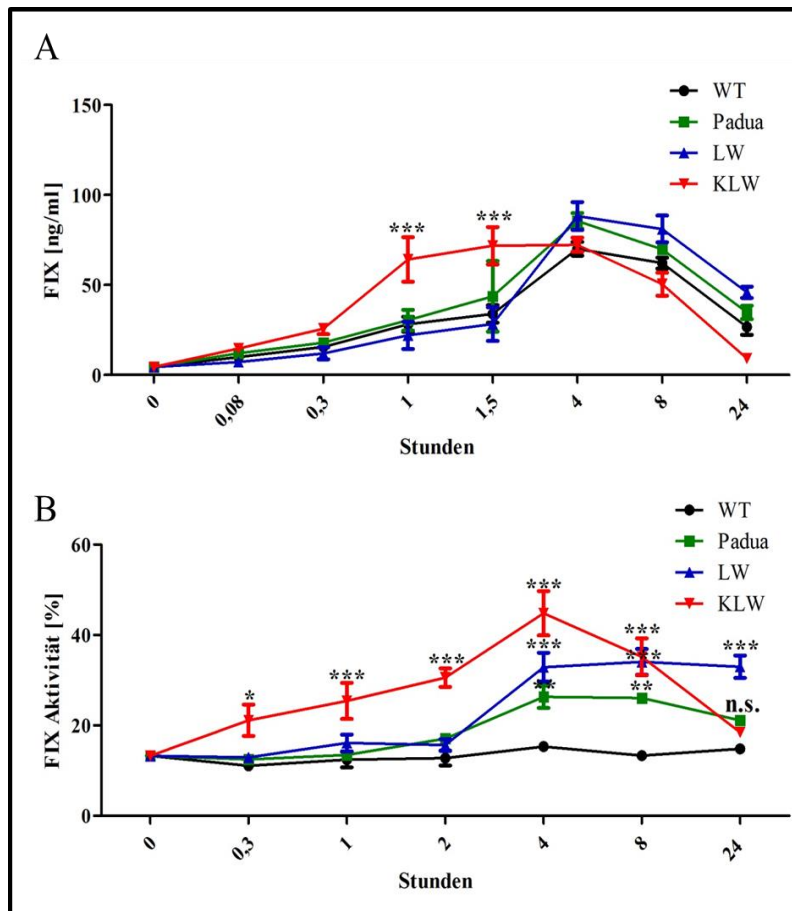
Die photometrische Detektion ergab eine deutliche Reduktion an gebundenem FIX K LW Protein ( $0,46 \pm 0,001$  OD 495 nm) im Vergleich zum Wildtyp ( $1,00 \pm 0,005$  OD 495 nm) und den anderen beiden hyperaktiven Varianten (Padua:  $1,07 \pm 0,012$  OD 495 nm und LW:  $0,91 \pm 0,013$  OD 495 nm) (Abbildung 3.12).

#### 3.3.1 Pharmakokinetik nach subkutaner Injektion

Der Einfluss der *in vitro* getesteten verminderten Kollagen Typ IV Bindungsaffinität auf die Pharmakokinetik des FIX K LW Proteins *in vivo* wurde in den folgenden 2 Experimenten untersucht. In einem ersten Experiment wurden Hämophilie B Mäusen (B6.129P2-F9<sup>tm1DWS</sup>/J) 20 µg der aufgereinigten FIX Proteinvarianten subkutan in die

rechte Flanke injiziert und nach definierten Zeitpunkten retroorbital Blut entnommen. Das Mausplasma wurde anschließend mittels ELISA auf die FIX Konzentration und mittels aPTT auf die FIX Aktivität hin untersucht (siehe Abschnitt 2.10.5). Bereits 20 min nach Injektion zeigte sich bei der K LW Variante im Vergleich mit dem Wildtyp ( $15,59 \pm 1,94$  ng/ml) sowie der Padua ( $17,88 \pm 2,36$  ng/ml) und der LW Variante ( $11,98 \pm 3,35$  ng/ml) ein tendenziell höherer Anstieg der FIX Konzentration im Plasma mit  $26,64 \pm 2,91$  ng/ml. Diese erhöhte Plasmaverfügbarkeit erwies sich an den beiden Zeitpunkten 1 h und 1,5 h post-Injektion als signifikant mit  $64,20 \pm 12,38$  ng/ml beziehungsweise  $71,81 \pm 10,33$  ng/ml. Die anderen drei FIX Varianten zeigten ebenfalls einen Anstieg der FIX Konzentration, der allerdings im Vergleich zur K LW Variante nicht annähernd so drastisch ausfiel (WT:  $33,95 \pm 4,86$  ng/ml; Padua:  $43,67 \pm 19,62$  ng/ml und LW:  $28,29 \pm 9,33$  ng/ml). Erst 4 h nach Injektion erreichten schließlich auch diese Varianten ähnliche Konzentrationen von im Durchschnitt  $79,69 \pm 3,20$  ng/ml. Im weiteren Verlauf erfolgte schließlich bis hin zum ermittelten Zeitpunkt nach 24 h die allmähliche Eliminierung des FIX Proteins aus dem Plasma (WT:  $26,73 \pm 4,37$  ng/ml; Padua:  $34,75 \pm 3,70$  ng/ml; LW:  $45,92 \pm 3,13$  ng/ml und K LW:  $9,16 \pm 0,81$  ng/ml). Wobei anzumerken ist, dass die Elimination der K LW Variante erheblich schneller zu verlaufen schien als beim FIX WT oder bei den anderen beiden hyperaktiven Varianten (Abbildung 3.13 A). Die erhöhte Bioverfügbarkeit der K LW Variante nach subkutaner Injektion zeigte sich auch in den ermittelten FIX Aktivitäten (Abbildung 3.13 B). Der WT wies entsprechend der zuvor ermittelten FIX Konzentrationen keine Änderung in der Aktivität auf, sondern schwankte vielmehr nur im Bereich des Hintergrundes mit einer durchschnittlichen FIX Aktivität von  $13,12 \pm 0,55\%$ . Die K LW Variante hingegen zeigte aufgrund der erhöhten Bioverfügbarkeit in Kombination mit der Hyperaktivität eine bis hin zu 8 h andauernde signifikant gesteigerte Aktivität mit einem Maximum bei 4 h von  $44,81 \pm 4,90\%$ . Allerdings zeigte sich auch in der aPTT Messung ein drastischer Abfall der Aktivität der K LW Variante bis nahezu auf den Ausgangswert mit  $18,47 \pm 0,51\%$  24 h nach subkutaner Injektion. Zudem erreichten die beiden anderen hyperaktiven Varianten Padua und LW aufgrund ihrer Mutationen ebenfalls signifikant gesteigerte Aktivitäten gegenüber den WT von maximal  $26,33 \pm 2,46\%$  beziehungsweise  $34,07 \pm 2,87\%$  4 bis 8 h nach erfolgter Injektion, welches ebenfalls im Einklang mit den zuvor ermittelten FIX Konzentrationen im Plasma war.



**Abbildung 3.13**

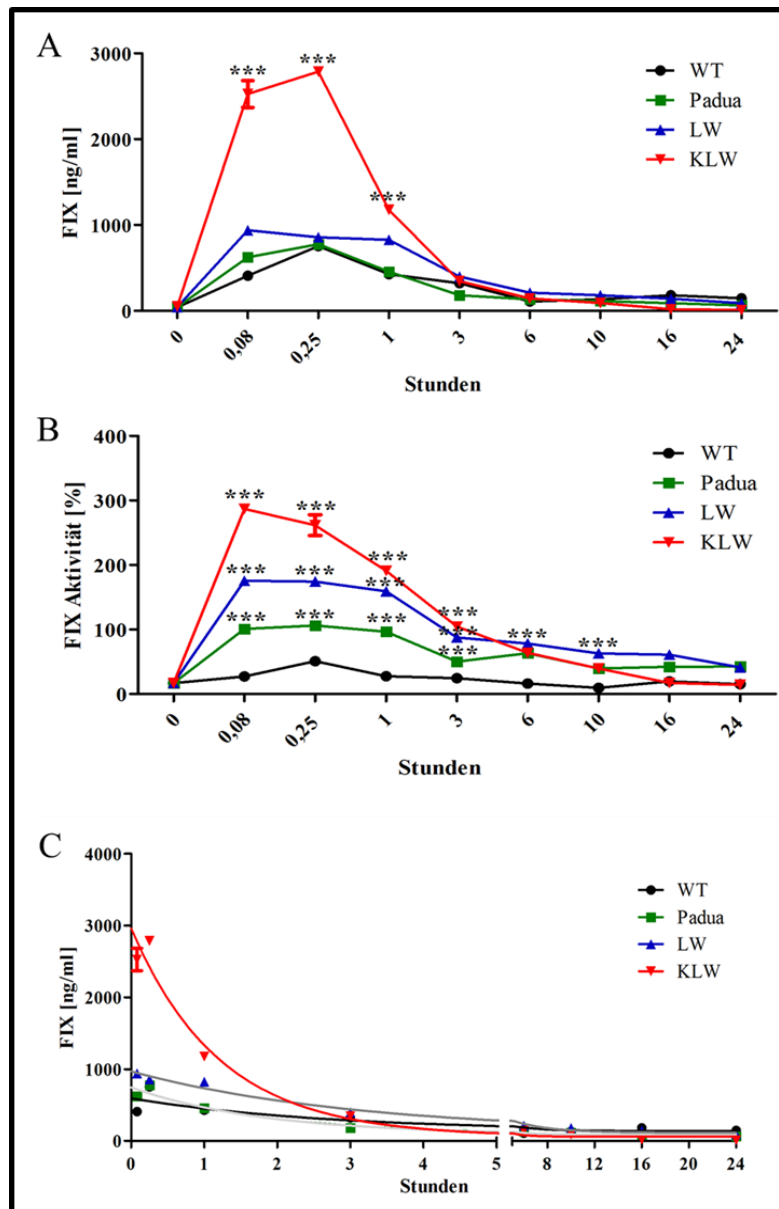
Pharmakokinetik nach subkutaner Injektion von 20 µg rekombinant aufgereinigten FIX Varianten in Hämophilie B Mäusen. Nach der Injektion wurde den Mäusen zu definierten Zeiten Blut abgenommen und das Plasma auf die vorhandene FIX Konzentration (A), sowie die vorhandene FIX Aktivität (B) hin untersucht. Die verminderte Bindung an Kollagen Typ IV resultiert in einer erhöhten Bioverfügbarkeit der FIX K LW Variante im Vergleich zum WT und den beiden anderen hyperaktiven Varianten. n=2-5, MW ± SEM, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; ANOVA, Bonferroni Post-Test.

### 3.3.2 Pharmakokinetik nach intravenöser Injektion

Eine genauere Betrachtung der Pharmakokinetik lieferte die intravenöse Injektion von 10 µg rekombinant aufgereinigten FIX Varianten in Hämophilie B Mäusen (B6.129P2-F9<sup>tm1DWS/J</sup>). Auch hier erfolgte die Blutentnahme zu definierten Zeitpunkten gefolgt von der Messung der im Plasma vorhandenen FIX Konzentration mittels ELISA, sowie der FIX Aktivität mittels aPTT (siehe Abschnitt 2.10.5). Durch die intravenöse Injektion und die damit einhergehende sofortige intravaskuläre Verfügbarkeit konnte bereits ein Anstieg der FIX Konzentration im Mausplasma nach nur 5 min verzeichnet werden. Hierbei pendelten die gemessenen FIX Konzentrationen für den Wildtyp, sowie für die Padua und LW Varianten, um durchschnittlich  $673,84 \pm 37,88$  ng/ml. Bereits 1 h nach Injektion konnte eine Abnahme auf nur noch  $569,58 \pm 64,33$  ng/ml verzeichnet werden und nach weiteren 2 h konnten nur noch durchschnittlich  $300,37 \pm 32,93$  ng/ml FIX im Plasma detektiert werden. Diese Abnahme setzte sich regressiv bis zum Endpunkt von 24 h fort. Die K LW Variante hingegen zeigte bereits 5 min nach Injektion eine FIX

Konzentration von  $2525,55 \pm 155,89$  ng/ml im Plasma und stieg sogar 10 min später auf bis zu  $2785,25 \pm 50,97$  ng/ml an. Interessanterweise erfolgte ein drastischer Abfall um zwei Drittel auf  $1176,55 \pm 6,15$  ng/ml bereits 1 h nach Injektion und 3 h später lag dieser schon auf demselben Niveau wie die anderen Varianten mit  $345,14 \pm 5,55$  ng/ml und setzte sich ebenso bis zum Endpunkt von 24 h fort (Abbildung 3.14 A). Die erhöhte FIX Konzentration im Mausplasma nach Injektion der K LW Variante spiegelte sich ebenso in den gemessenen Aktivitäten wider (Abbildung 3.14 B). Hierbei zeigte sich eine maximale FIX Aktivität von  $286,70 \pm 3,89\%$  schon 5 min nach Injektion. Nur 15 min nach Injektion konnte ein Abfall der Aktivität auf  $261,64 \pm 16,13\%$  verzeichnet werden, welcher sich regressiv fortsetzte. So lag die Aktivität nach 3 h bei nur noch  $104,63 \pm 5,21\%$  und nach weiteren 3 h bei einem zu den beiden anderen hyperaktiven Varianten vergleichbaren Wert von  $63,75 \pm 0,70\%$ . Eine weitere Reduktion um nochmal circa die Hälfte erfolgte zum Zeitpunkt von 10 h nach Injektion mit nur noch  $39,47\%$ . Bis zu diesem Zeitpunkt lagen alle ermittelten Aktivitäten signifikant deutlich über der Aktivität des FIX Wildtyp Proteins. Entsprechend der zuvor ermittelten FIX Konzentrationen im Plasma zeigte der Wildtyp zwar einen Anstieg der FIX Aktivität auf bis zu  $50,67 \pm 6,63\%$  15 min nach erfolgter Injektion, sank dann aber bereits zum Zeitpunkt von 3 h auf bis zu  $24,46 \pm 0,74\%$  und schwankte letztendlich den restlichen Zeitraum über um den Hintergrund mit durchschnittlich  $17,19 \pm 0,60\%$ . Trotz vergleichbarer FIX Konzentrationen im Plasma zeigten die beiden anderen hyperaktiven Varianten Padua und LW eine signifikant erhöhte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. So erreichte die Padua Variante 15 min nach Injektion ein Maximum von  $106,22 \pm 0,89\%$  und bei der LW Variante konnte sogar eine Aktivität von  $175,47 \pm 2,09\%$  gemessen werden. Ähnlich wie beim Wildtyp konnte auch hier ein Rückgang der Aktivität um etwa die Hälfte auf  $50,17 \pm 2,06\%$  bei der Padua Variante und  $87,38 \pm 0,69\%$  bei der LW Variante beobachtet werden. Weitere 3 h später lagen dann alle drei hyperaktiven Varianten nahezu gleichauf mit einer durchschnittlichen Aktivität von  $68,35 \pm 3,07\%$ . Anders als die K LW Variante, welche über den gesamten Zeitverlauf einen drastischen Verlust der anfänglich sehr hohen FIX Konzentrationen und damit einhergehend der FIX Aktivität aufwies, konnte bei der Padua und der LW Variante zum Endzeitpunkt aufgrund ihrer Hyperaktivität noch eine FIX Aktivität von  $41,93 \pm 0,36\%$  gemessen werden. Die Hypothese der scheinbar schnelleren Elimination der K LW

Variante konnte auch mathematisch durch Berechnung von Parametern aus der Pharmakokinetik belegt werden (Abbildung 3.14 C). Unter Annahme eines Zwei-Kompartimenten Modells, gebildet aus dem Vaskulärem System und dem extravaskulär lokalisierten Kollagen Typ IV, erfolgte die Berechnung einer exponentiellen Funktion zweiter Ordnung mit Hilfe des GraphPad Prism Programms. Der Berechnung nach betrug die maximale Konzentration an FIX beim Wildtyp, sowie bei der Padua und LW Variante, durchschnittlich  $769,27 \pm 108,30$  ng/ml, wohingegen der Wert bei der K LW Variante mit 2959 ng/ml errechnet wurde. Dies entspricht somit einer Vervielfachung der im Plasma verfügbaren FIX Konzentration bei der K LW Variante. Als weiterer Parameter wurde noch die Halbwertszeit der Eliminationsphase berechnet. Diese betrug bei der K LW Variante nur 0,84 h im Vergleich zum Wildtyp und den anderen beiden Varianten mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von  $1,75 \pm 0,27$  h. Als letzten Parameter zur Veranschaulichung der rasanten Elimination lohnte sich zudem ein Blick auf die errechnete Geschwindigkeitskonstante. Diese ergab eine nahezu doppelt so schnell verlaufende Elimination der K LW Variante aus dem Plasma mit einem Wert von 0,82 verglichen mit den anderen Varianten mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeitskonstante von  $0,42 \pm 0,07$ . Zusammengefasst ergab sich eine initial erhöhte Bioverfügbarkeit der K LW Variante nach subkutaner, sowie nach intravenöser Injektion, allerdings einhergehend mit einer schnelleren Elimination aus dem Plasma.



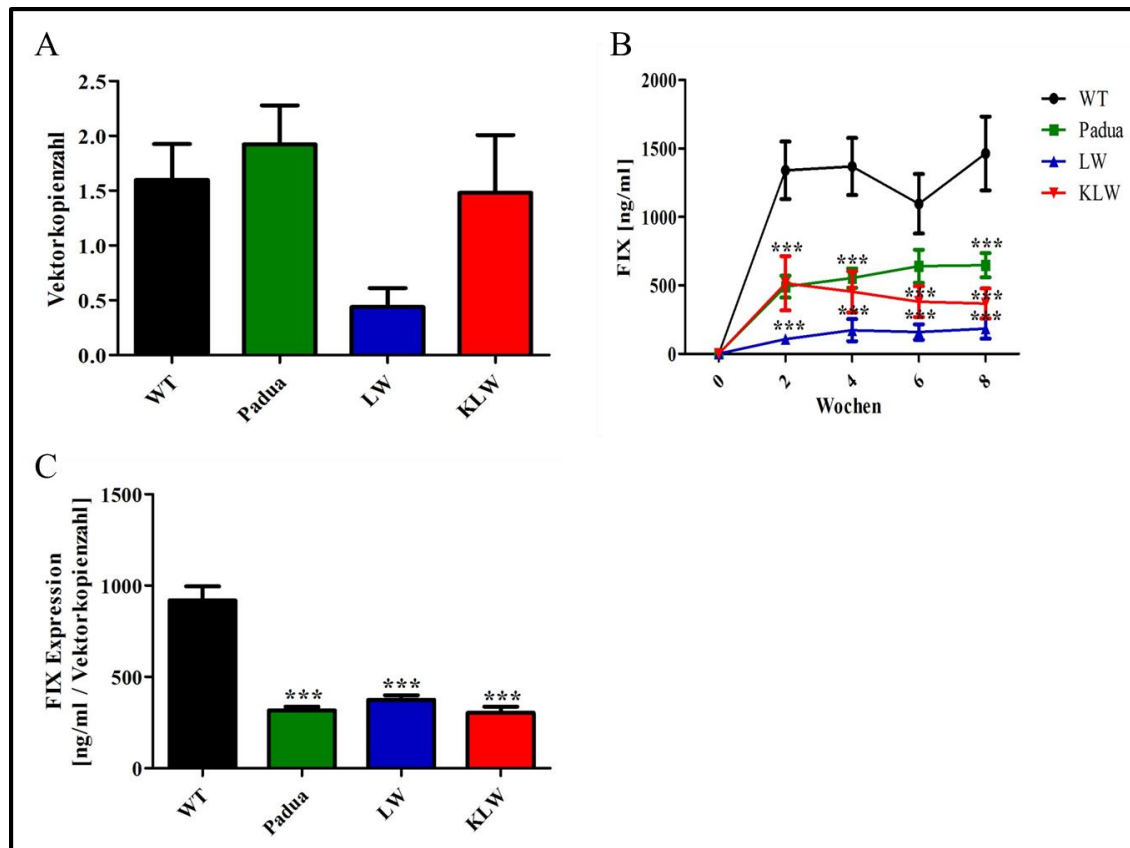
**Abbildung 3.14**  
Pharmakokinetik nach intravenöser Injektion von 10 µg rekombinant aufgereinigten FIX Varianten in Hämophile B Mäusen. Nach der Injektion wurde den Mäusen zu definierten Zeiten Blut entnommen und das Plasma auf die vorhandene FIX Konzentration (A), sowie die vorhandene FIX Aktivität (B) hin untersucht. Auch in der intravenösen Injektion zeigte sich eine erhöhte Bioverfügbarkeit der K LW Variante, mutmaßlich aufgrund ihrer verminderten Bindung an Kollagen Typ IV. (C) Einhergehend mit der erhöhten Bioverfügbarkeit zeigte die pharmakokinetische Berechnung unter Annahme eines Zwei-Kompartimenten Systems allerdings auch eine deutlich schnellere Elimination der K LW Variante gegenüber den anderen beiden Varianten und dem WT. (A; C) n=3; (B) n=2 MW ± SEM, \*\*\*p < 0,001; ANOVA, Bonferroni Post-Test.

### 3.4 Effizienz der hyperaktiven FIX Varianten in der AAV Gentherapie

Nachdem die FIX Varianten zuvor funktionell, immunologisch und pharmakokinetisch charakterisiert wurden, sollte abschließend ihre Effizienz und Sicherheit in einer AAV Gentherapie, angewandt an Hämophilie B Mäusen (B6.129P2-F9<sup>tm1DWS</sup>/J) untersucht werden. Hierzu wurden AAV Partikel des Serotyps 8 verwendet mit der jeweiligen FIX Variante als Transgen und unter der Kontrolle des leberspezifischen Promotors LP1, welcher derzeit auch in klinischen Studien Verwendung findet (150). Zur Überprüfung der Effizienz, sowie der Sicherheit der hyperaktiven Varianten erfolgte die Gentherapie in einer niedrigen Dosisstufe mit  $5 \times 10^{10}$  Vektorgenomen (vg)/Kilogramm(kg) und in einer hohen Dosisstufe mit  $2 \times 10^{11}$  vg/kg. Die Applikation der Viruspartikel erfolgte intravenös mit einem Injektionsvolumen von 200  $\mu$ l. Zur Analyse wurde den behandelten Tieren beginnend in Woche Null im zweiwöchigen Abstand retroorbital Blut entnommen und die vorhandene FIX Konzentration im Plasma mittels FIX ELISA, sowie die daraus resultierende FIX Aktivität mittels aPTT Assay ermittelt. Final wurde zur Beurteilung der Funktionalität des Gentransfers ein *Tail Clip Assay* durchgeführt und zur Bestimmung der Transduktionseffizienz die Lebern entnommen (siehe Abschnitt 2.10.6).

#### 3.4.1 AAV Gentherapie in der niedrigen Dosis ( $5 \times 10^{10}$ vg/kg) zur Überprüfung der Effizienz

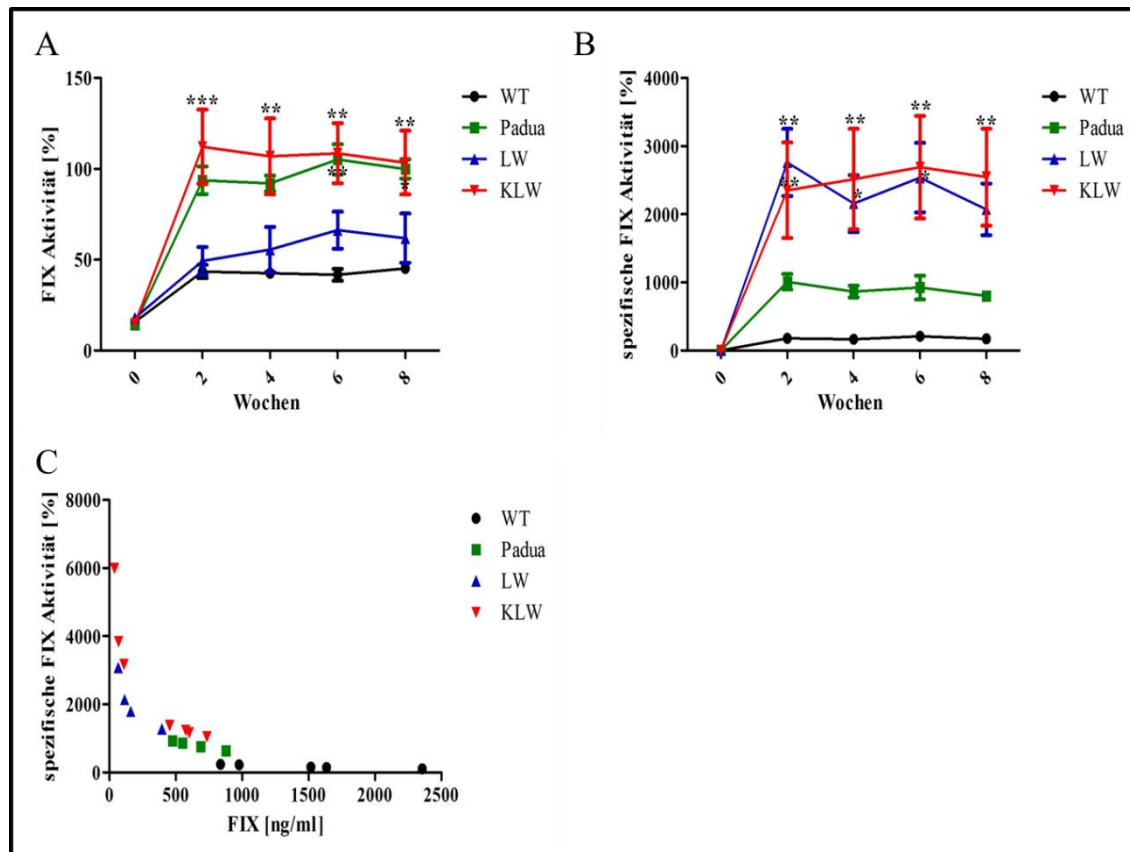
In der niedrigen Dosisstufe waren die nach der Gabe der AAV-Vektorpartikel in der Leber DNA detektierbaren Vektorkopienzahlen (vz) zwischen dem Wildtyp ( $1,6 \pm 0,3$  vz), der Padua Variante ( $1,9 \pm 0,4$  vz) und der KLV Variante ( $1,5 \pm 0,5$  vz) vergleichbar. Trotz vorab durchgeführter Titrierung der Viruspartikel und nachfolgender Überprüfung mittels SDS-PAGE wiesen mit LW-Viruspartikeln behandelte Mäuse hingegen eine deutlich geringere Vektorkopienzahl auf ( $0,4 \pm 0,2$  vz) (Abbildung 3.15 A).



**Abbildung 3.15** Analyse der Effizienz der Transduktion, sowie Expression nach AAV Gentherapie in Hämophilie B Mäusen. Nach erfolgter Gentherapie von Hämophilie B Mäusen (B6.129P2-F9<sup>tm1DWS/J</sup>) mit AAV8 Partikeln und den FIX Varianten als Transgen in der niedrigen Dosisstufe ( $5 \times 10^{10}$  vg/kg) erfolgte final die Bestimmung der Vektorkopienzahlen mittels qPCR aus den Lebern von behandelten Mäusen (A). Hierbei zeigte sich eine vergleichbare Vektorkopienzahl zwischen den mit Wildtyp, Padua und KLW behandelten Mäusen, wohingegen die mit der LW Variante als Transgen behandelten Mäuse trotz Titrierung deutlich geringere Vektorkopienzahlen aufwiesen. (B) Dies spiegelte sich auch in der Ermittlung der FIX Konzentration mittels ELISA im Plasma wieder. Die geringsten FIX Konzentrationen konnten bei der LW Variante verzeichnet werden, wohingegen die Padua und KLW Variante zwar dicht beieinander lagen aber dennoch deutlich geringere FIX Konzentrationen im Plasma verglichen mit dem Wildtyp aufwiesen. (C) Die Berechnung der Expression, sprich die FIX Konzentration normalisiert auf die Vektorkopienzahl, ergab ein ähnliches Bild wie bereits zuvor in den Einzelzellklonen ermittelt (siehe Abbildung 3.3). Somit zeigten alle drei hyperaktiven Varianten eine signifikant geringere Expression verglichen mit dem Wildtyp.  $n=5$  für WT;  $n=4$  für Padua und LW und  $n=7$  für KLW,  $MW \pm SEM$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; ANOVA, Bonferroni Post-Test.

Die nicht gleichsam effizient erfolgte Transduktion spiegelte sich auch in der Bestimmung der FIX Konzentration im Mausplasma mittels ELISA wider (Abbildung 3.15 B). Im Wochenverlauf zeigte der Wildtyp eine FIX Konzentration von durchschnittlich  $1317,67 \pm 109,12$  ng/ml. Trotz vergleichbarer Vektorkopienzahlen wiesen sowohl die Padua Variante ( $583,05 \pm 44,29$  ng/ml), als auch die KLW Variante ( $429,72 \pm 70,29$  ng/ml) signifikant geringere FIX Konzentrationen im Plasma auf. Die geringsten FIX Konzentrationen konnten, unter anderem aufgrund der geringen Vektorkopienzahl, bei der LW Variante mit nur  $155,91 \pm 29,59$  ng/ml gemessen werden.

Interessanterweise konnte die vorab bereits gezeigte geringere Expression der hyperaktiven FIX Varianten im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 3.3) auch nach erfolgter AAV Gentherapie beobachtet werden (Abbildung 3.15 C). Im Vergleich zum Wildtyp mit einer FIX Proteinexpression von  $918,7 \pm 140,72$  ng/ml wiesen alle hyperaktiven Varianten eine signifikant geringere Proteinexpression auf (Padua:  $317,3 \pm 27,93$  ng/ml; LW:  $374,5 \pm 39,38$  ng/ml und K LW:  $302,90 \pm 63,00$  ng/ml). Hierbei ist anzumerken, dass zwischen den hyperaktiven Varianten keinerlei signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression bestand. Die Bestimmung der FIX Aktivität mittels aPTT Assay nach erfolgter Gentherapie sollte schließlich Aufschluss über die hämostatische Effizienz der hyperaktiven Varianten geben. Vorab zu erwähnen war die konstant gebliebene Aktivität über den gesamten Beobachtungszeitraum von 8 Wochen. Der Wildtyp erreichte hierbei in der geringen Vektordosis eine FIX Aktivität von durchschnittlich  $43,22 \pm 1,35\%$ . Knapp darüber liegend befand sich die LW Variante, die aufgrund ihrer geringen Vektorkopienzahlen, und trotz ihrer Hyperfunktionalität, nur eine FIX Aktivität von  $58,25 \pm 5,27\%$  erreichte. Die Padua Variante ( $97,72 \pm 3,24\%$ ) und die K LW Variante ( $107,80 \pm 8,97\%$ ) lagen nahezu gleichauf und wiesen eine signifikant erhöhte FIX Aktivität verglichen mit dem Wildtyp auf (Abbildung 3.16 A). Eine genauere Differenzierung der unterschiedlichen Aktivitäten ergab sich nach der Berechnung der spezifischen Aktivität, welche sich aus der mittels aPTT bestimmten Aktivität normiert auf die FIX Konzentration, ergibt (Abbildung 3.16 B). Für den Wildtyp FIX ergab sich eine spezifische Aktivität von  $180,70 \pm 11,32\%$ . Mit einer 5-fach gesteigerten spezifischen Aktivität folgte die Padua Variante mit  $899,45 \pm 55,98\%$ . Die beiden anderen hyperaktiven Varianten lagen nahezu auf dem gleichen Aktivitätslevel von  $2382,62 \pm 215,07\%$  für die LW und  $2526,71 \pm 343,19\%$  für die K LW Variante. Dies bedeutete eine 14-fach erhöhte spezifische Aktivität dieser beiden Varianten gegenüber dem Wildtyp und sogar nochmal ums 3-fache gesteigert im Vergleich zur Padua Variante.



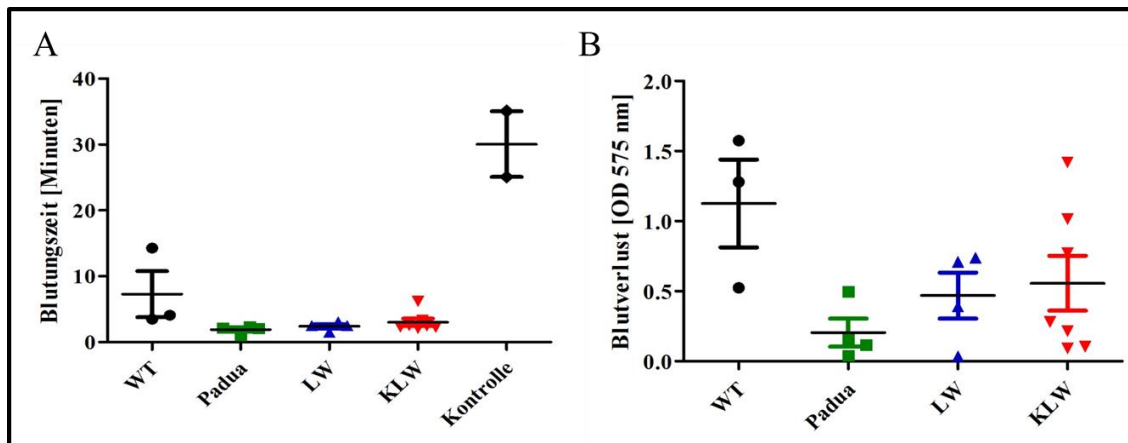
**Abbildung 3.16** Die Überprüfung der Effizienz der hyperaktiven FIX Varianten erfolgte mittels Bestimmung der FIX Aktivität. (A) Hierbei zeigte sich bereits in der Messung der aPTT eine signifikant erhöhte FIX Aktivität der KLW und Padua Varianten gegenüber dem Wildtyp. Aufgrund der geringen Vektorkopienzahl und der damit verbundenen geringen FIX Konzentration wies die LW Variante zwar tendenziell eine erhöhte FIX Aktivität gegenüber dem Wildtyp auf, welche allerdings nicht signifikant war. (B) Erst die Berechnung der spezifischen Aktivität zeigte die erwartete Aktivitätssteigerung. Die LW und KLW Variante wiesen im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant erhöhte spezifische FIX Aktivität auf, wohingegen die FIX Padua nur eine tendenziell erhöhte spezifische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp aufwies. (C) Der zwar geringe, aber dennoch vorhandene Vorteil der KLW Variante zeigte sich zudem in der Korrelation der spezifischen Aktivität zur FIX Konzentration.  $n=5$  für WT;  $n=4$  für Padua und LW und  $n=7$  für KLW,  $MW \pm SEM$ ,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ; ANOVA, Bonferroni Post-Test.

Eine anschauliche Verdeutlichung lieferte zudem die Korrelation zwischen der spezifischen Aktivität und der mittels ELISA gemessenen FIX Konzentration im Plasma (Abbildung 3.16 C). Verglichen mit dem FIX Wildtyp wiesen alle hyperaktiven Varianten trotz geringerer FIX Konzentrationen im Plasma eine deutlich erhöhte spezifische Aktivität auf. Zudem könnte es den Anschein erwecken, als hätte die KLW Variante insbesondere bei niedrigeren Konzentrationen doch einen gewissen Vorteil gegenüber der LW Variante. Neben der Aktivitätsbestimmung mittels aPTT wurde zusätzlich ein chromogener Assay angewandt (siehe Abschnitt 2.9.8). Die daraus



resultierenden Ergebnisse korrelierten mit den oben beschriebenen und wurden daraufhin nicht im Ergebnisteil mit aufgenommen.

Final wurde bei den gentherapierten Mäusen noch ein sogenannter *Tail Clip Assay*, wie unter Abschnitt 2.10.3 beschrieben, durchgeführt. Vorteil der Verwendung dieser Form des *Tail Clips* ist die Unterscheidung zwischen der primären und sekundären Hämostase. Bei der primären Hämostase spielen die Thrombozyten die Hauptrolle, wohingegen die Gerinnungsfaktoren erst bei der sekundären Hämostase von Relevanz sind (65). Die Beobachtung der primären Hämostase in den ersten 3 min diente als Ausschlusskriterium. Sollte eine Maus innerhalb dieser 3 min nicht aufhören zu bluten, so muss bei diesem Tier von einem Defekt der Thrombozyten ausgegangen werden und dies könnte die nachfolgende sekundäre Hämostase maßgeblich beeinflussen. Weder in der hier gezeigten noch in der nachfolgend aufgeführten hohen Dosis konnte dies beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), sodass alle Mäuse für den Part der sekundären Hämostase, sprich der eigentlichen Blutgerinnung, berücksichtigt werden konnten. Hierbei wurde als Parameter zum einen die tatsächliche Blutungsdauer über den gesamten Zeitraum von 60 min, sowie die Blutmenge, photometrisch bei einer Absorption von 575 nm bestimmt, ermittelt. Die Blutungszeit war bei allen gentherapierten Mäusen signifikant verbessert gegenüber den nicht behandelten Kontrollmäusen ( $30,07 \pm 4,98$  min) (Abbildung 3.17 A). Die Wildtyp Variante ( $7,29 \pm 3,50$  min) zeigte zwar tendenziell eine leicht erhöhte Blutungszeit, diese war allerdings nicht signifikant gegenüber den hyperaktiven Varianten verändert (Padua:  $2,23 \pm 0,08$  min; LW:  $2,38 \pm 0,46$  min und K LW:  $2,34 \pm 0,13$  min). Einen eher variablen Parameter stellte hingegen die photometrische Ermittlung des Blutverlustes dar. Trotz Schablone zum gezielten und genauen Anritzen des Mausschwanzes kam es zu einigen Schwankungen zwischen mit den gleichen Vektorpartikeln behandelten Mäusen (Abbildung 3.17 B). Auch hier zeigte der Wildtyp einen tendenziell erhöhten Blutverlust ( $1,13 \pm 0,31$  OD 575 nm) gegenüber den hyperaktiven Varianten (Padua:  $0,26 \pm 0,10$  OD 575 nm; LW:  $0,49 \pm 0,16$  OD 575 nm und K LW:  $0,55 \pm 0,20$  OD 575 nm) allerdings ebenfalls ohne signifikanten Unterschied. Somit konnte bei allen gentherapierten Mäusen eine funktionelle Gerinnung, sowie eine signifikante Verbesserung der Hämostase gegenüber den unbehandelten Mäusen nachgewiesen werden.

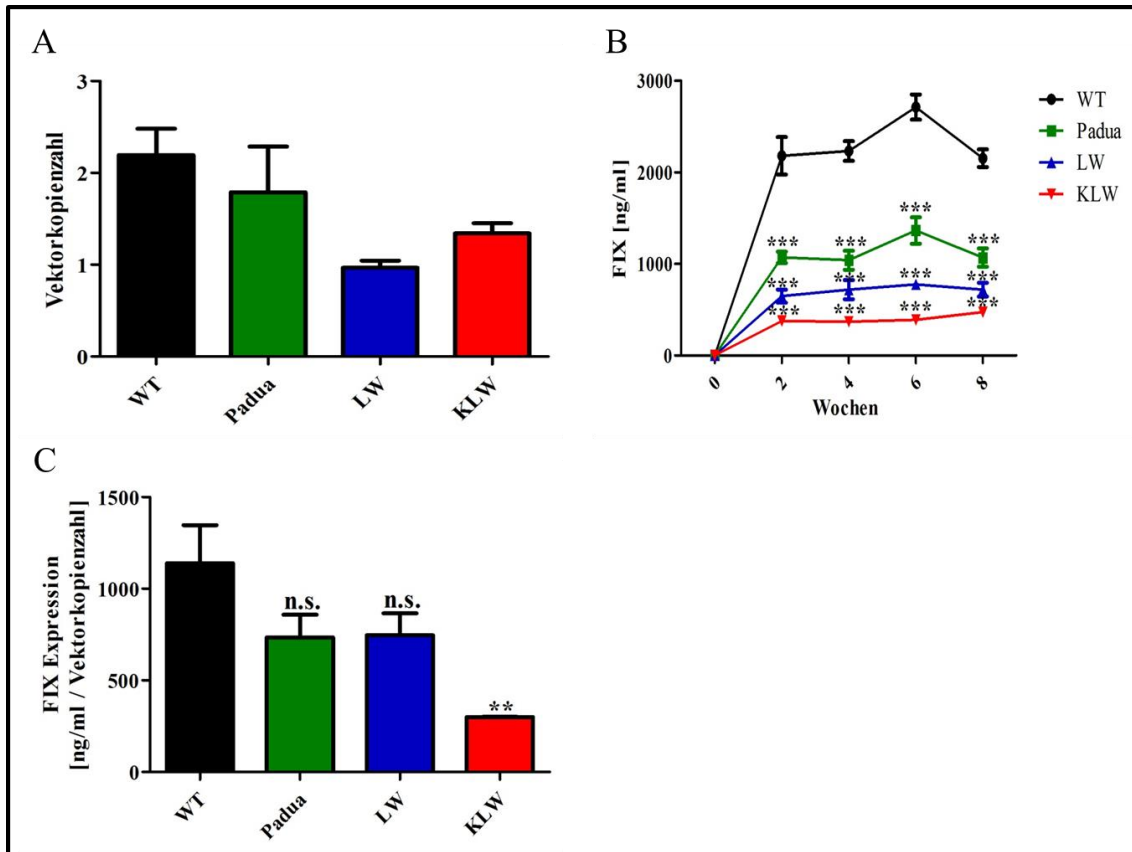


**Abbildung 3.17** Darstellung der Blutungszeit (A) sowie des photometrisch ermittelten Blutverlustes (B) in einem *Tail Clip Assay* von AAV Gentherapie-behandelten Hämophilie B Mäusen. In beiden bestimmten Parametern zeigte der Wildtyp zwar tendenziell eine leichte Blutungstendenz allerdings ohne signifikanten Unterschied zu den hyperaktiven Varianten. Insgesamt fand bei allen Varianten eine signifikante Verbesserung der sekundären Hämostase statt.  $n=3$  für WT;  $n=4$  für Padua und LW und  $n=7$  für KLV,  $MW \pm SEM$ ; ANOVA, Bonferroni Post-Test.

### 3.4.2 AAV Gentherapie in der hohen Dosis ( $2 \times 10^{11}$ vg/kg)

Die Effizienz der hyperaktiven FIX Varianten und insbesondere der LW und KLV Variante, gegenüber dem Wildtyp wurde bereits in der vorausgegangenen niedrigen Dosisstufe demonstriert. In der höheren Dosisstufe mit  $2 \times 10^{11}$  vg/kg, sprich einer 4-fachen Dosis an AAV Partikeln, wurde zusätzlich der Aspekt der Sicherheit mit berücksichtigt. Wie auch bereits in der niedrigen Dosis beobachtet, lieferte die Bestimmung der Vektorkopienzahlen auch in diesem Fall trotz Titrierung ein divergentes Abbild. So lagen der Wildtyp mit  $2,19 \pm 0,29$  vz und die Padua Variante mit  $1,79 \pm 0,50$  vz recht nah beieinander. Im Gegensatz dazu erfolgte die Transduktion in der LW Variante ( $0,97 \pm 0,08$  vz) und der KLV Variante ( $1,34 \pm 0,11$  vz) weniger effizient (Abbildung 3.18 A). Dies beeinflusste maßgeblich die ermittelten FIX Konzentrationen im Plasma mittels FIX ELISA (Abbildung 3.18 B). Mit durchschnittlich  $2320,84 \pm 79,34$  ng/ml wies der FIX Wildtyp die höchsten gemessenen FIX Konzentrationen im Plasma auf. Bereits signifikant reduziert folgte die Padua Variante mit  $1136,68 \pm 55,87$  ng/ml und die LW Variante mit  $714,93 \pm 38,40$  ng/ml. Die niedrigsten FIX Konzentrationen wurden in diesem Experiment bei der KLV Variante mit  $401,41 \pm 14,75$  ng/ml gemessen. Wie erwartet, zeigte auch in der hohen Vektordosis der FIX Wildtyp die höchste berechnete Expression mit  $1138,22 \pm 208,45$  ng/ml. Erstaunlicherweise wiesen die beiden hyperaktiven Varianten Padua ( $734,07 \pm 124,18$

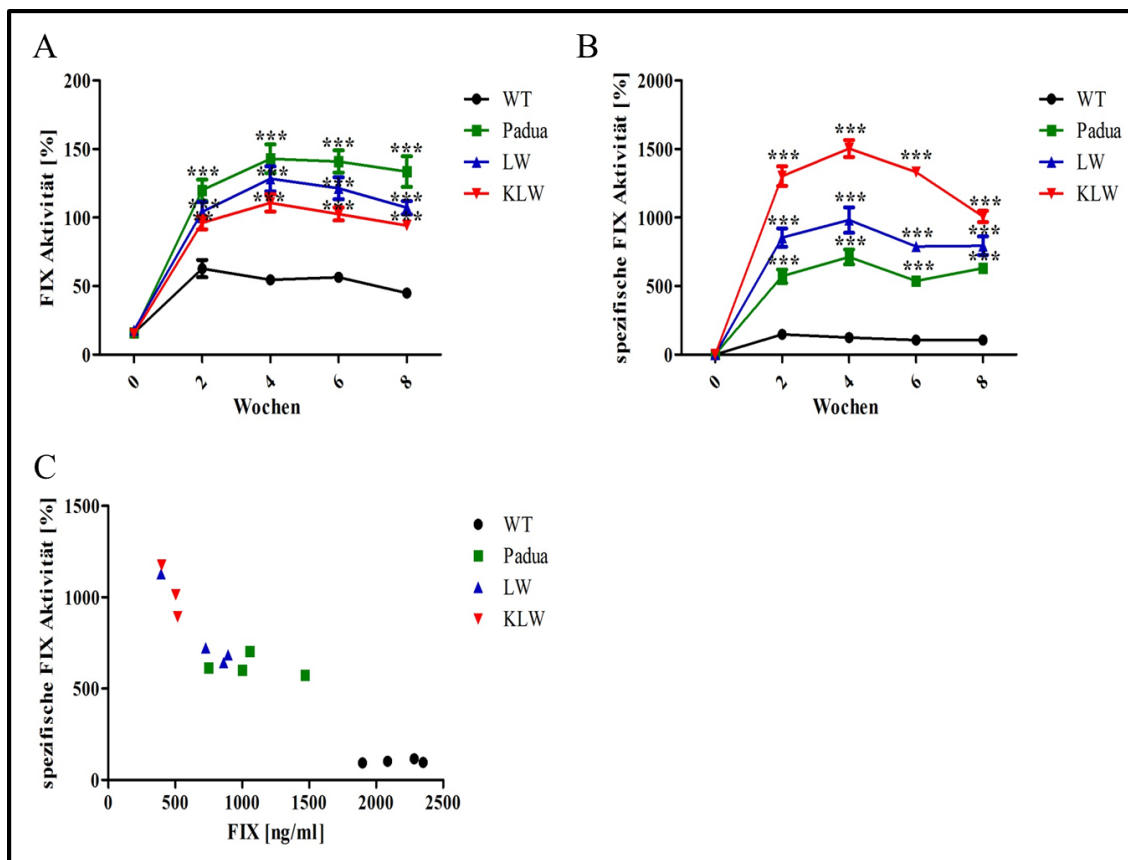
ng/ml) und LW ( $745,80 \pm 120,11$  ng/ml) nur eine allenfalls geringgradig reduzierte Expression auf, wohingegen die K LW Variante abermals signifikant geringer exprimiert wurde ( $299,52 \pm 2,04$  ng/ml) (Abbildung 3.18 C).



**Abbildung 3.18** Analyse der Effizienz der Transduktion, sowie Expression nach AAV Gentherapie in Hämophilie B Mäusen. Nach erfolgter Gentherapie von Hämophilie B Mäusen (B6.129P2-F9<sup>tm1DWS</sup>/J) mit AAV8 Partikeln und den FIX Varianten als Transgen in der vierfach erhöhten Dosisstufe ( $2 \times 10^{11}$  vg/kg) erfolgte final die Bestimmung der Vektorkopienzahlen mittels qPCR aus den Lebern von behandelten Mäusen (A). Hierbei zeigte sich eine vergleichbare Vektorkopienzahl zwischen den mit Wildtyp und Padua behandelten Mäusen, wohingegen die mit der LW und K LW Variante als Transgen behandelten Mäuse trotz Titrierung deutlich geringere Vektorkopienzahlen aufwiesen. (B) Dies beeinflusste maßgeblich die mittels FIX ELISA gemessenen FIX Konzentrationen. Die höchsten FIX Konzentrationen im Mausplasma wurden für den Wildtyp gemessen, wohingegen die hyperaktiven Varianten signifikant geringere Konzentrationen aufwiesen (C) Die Berechnung der Expression, sprich die FIX Konzentration normalisiert auf die Vektorkopienzahl, ergab die höchste FIX Expression für den Wildtyp. Die beiden hyperaktiven Varianten Padua und LW wurden geringgradig weniger hoch exprimiert. Die K LW Variante hingegen wies eine signifikant geringere FIX Expression im Vergleich zum Wildtyp auf.  $n=4$  für Wildtyp, Padua und LW und  $n=3$  für K LW,  $MW \pm SEM$ ,  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ; ANOVA, Bonferroni Post-Test.

Das signifikant geringere Expressionsniveau der K LW Variante im Vergleich zum Wildtyp wurden durch ihre Hyperaktivität mehr als kompensiert (Abbildung 3.19 A). Die beiden anderen hyperaktiven Varianten lagen in diesem Experiment nur tendenziell vermindert exprimiert vor. Der FIX WT zeigte über den Wochenverlauf eine

durchschnittliche und konstante FIX Aktivität von  $54,68 \pm 2,85\%$ . Die höchste Aktivität wurde bei der Padua Variante mit  $134,39 \pm 6,83\%$  gemessen, die LW Variante wies eine FIX Aktivität von  $115,36 \pm 5,64\%$  auf. Aufgrund der zuvor bestimmten geringsten FIX Expression wurde die Aktivität der K LW Variante mit nur  $100,96 \pm 3,70\%$  gemessen. Die Aktivität wurde neben der aPTT Messung auch mittels chromogenem Assay bestimmt, da sich allerdings ebenfalls keine Unterschiede zur aPTT Messung zeigten, wurde auf die Darstellung im Ergebnisteil verzichtet.

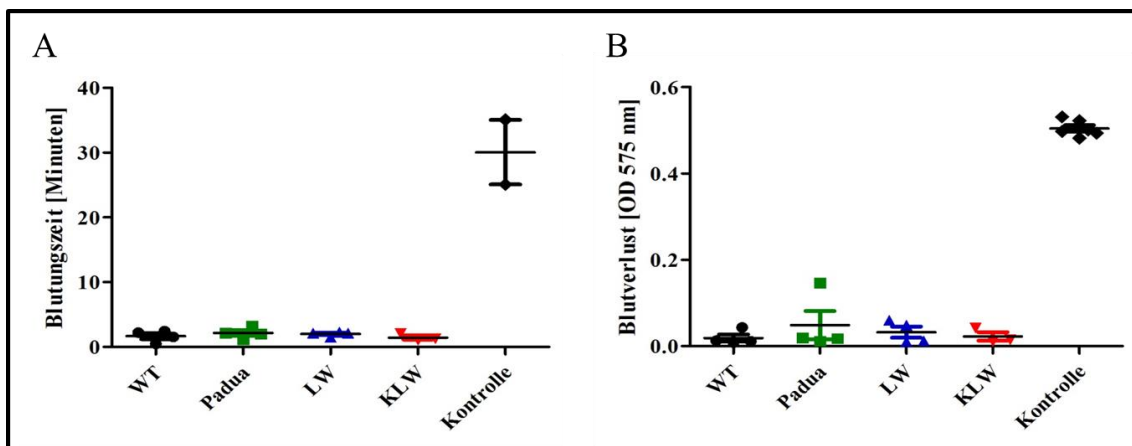


**Abbildung 3.19** Die Überprüfung der Effizienz der hyperaktiven FIX Varianten erfolgte mittels Bestimmung der FIX Aktivität. (A) Aufgrund der Aktivität steigernden Mutationen zeigten alle hyperaktiven Varianten eine signifikant erhöhte FIX Aktivität gegenüber dem Wildtyp. (B) Die Berechnung der spezifischen Aktivität ergab das bekannte Muster mit einer 5-fach gesteigerten Padua Variante, einer dieses Mal nur 7-fach gesteigerten LW Variante und eine 11-fach gesteigerte K LW Variante. (C) Auch in der hohen Dosis zeigte sich in der Korrelation der spezifischen Aktivität zur FIX Konzentration der Vorteil der K LW Variante gegenüber dem WT und den anderen beiden hyperaktiven Varianten Padua und LW.  $n=4$  für Wildtyp

Die Berechnung der spezifischen Aktivität hingegen führte abermals zum altbekannten Muster der hyperaktiven Varianten (Abbildung 3.19 B). Der Wildtyp zeigte, wie auch bei der verwendeten Vektordosis erwartet, eine spezifische Aktivität von  $120,58 \pm$

5,29%. Die Padua Variante wies abermals eine circa 5-fache Steigerung ( $613,61 \pm 23,55\%$ ) gegenüber dem Wildtyp auf und die LW Variante erreichte mit einer 7-fachen Steigerung eine Aktivität von  $855,02 \pm 35,08\%$ . Im Gegensatz dazu wies die K LW Variante eine circa 11-fach gesteigerte spezifische Aktivität auf mit durchschnittlich  $1286,85 \pm 45,10\%$ . Dies wird ebenfalls in der Korrelation der spezifischen Aktivität zur ermittelten Antigenkonzentration verdeutlicht (Abbildung 3.19 C). Insbesondere die K LW Variante scheint auch bei Verwendung von höheren Vektordosen einen klaren Vorteil zu haben.

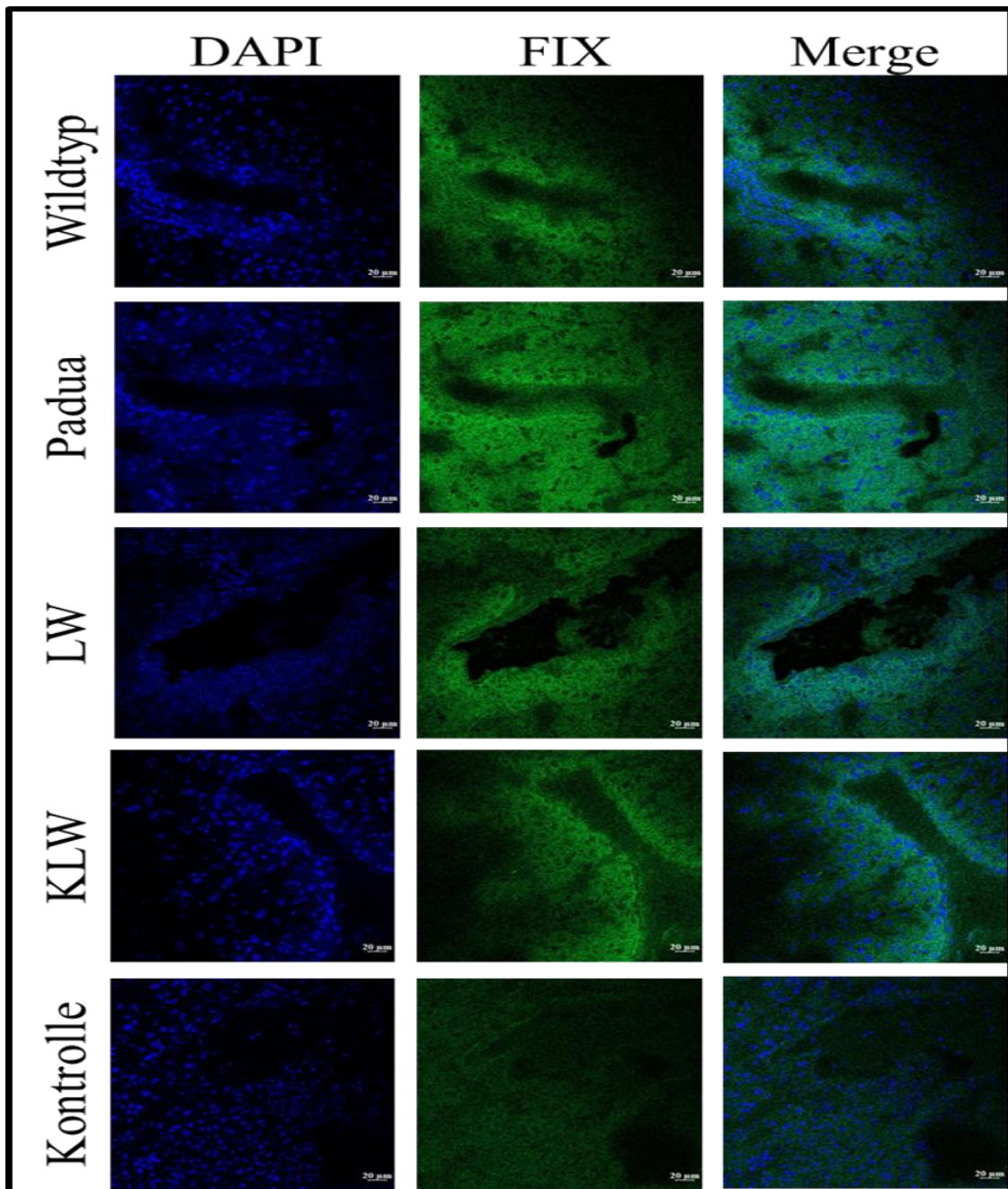
Auch in der hohen Vektordosis wurde final ein *Tail Clip Assay* durchgeführt (Abbildung 3.20). Aufgrund der in allen Varianten erreichten hohen Aktivitäten konnte weder mit der Blutungszeit (durchschnittlich  $1,85 \pm 0,18$  min), noch beim Blutverlust (durchschnittlich  $0,03 \pm 0,01$  OD 575 nm) ein Unterschied zwischen den Varianten ermittelt werden. Zudem wurde unter Verwendung der hohen Vektordosis die Gerinnung auf ein physiologisches Normalniveau angehoben und somit die Hämophilie B in den gentherapierten Mäusen vollständig korrigiert.



**Abbildung 3.20** Darstellung der Blutungszeit (A) sowie des photometrisch ermittelten Blutverlustes (B) in einem Tail Clip von AAV Gentherapie behandelten Hämophilie B Mäusen. Aufgrund der in allen Varianten erreichten hohen FIX Aktivitäten konnten keinerlei Blutungen mehr in den behandelten Mäusen nachgewiesen werden.  $n=3$  für WT;  $n=4$  für Padua und LW und  $n=7$  für K LW,  $MW \pm SEM$ ; ANOVA, Bonferroni Post-Test.

Aus den entnommenen Lebern der AAV gentherapierten Mäuse wurde neben der Bestimmung der Vektorkopienzahl in der DNA zudem noch Schnitte für eine immunhistochemische Untersuchung angefertigt, mittels der die Lokalisation transduzierter Hepatozyten im Lebergewebe bestimmt werden sollte. Die Zellkerne

wurden mittels DAPI Färbung kenntlich gemacht und FIX fluoreszierte aufgrund der Verwendung eines FITC-gekoppelten FIX-spezifischen Antikörpers im grünen Spektrum bei ca. 488 nm (siehe Abschnitt 2.9.13). Die FIX Expression ist als hellgrüne Färbung zu erkennen und konnte bei allen Varianten nur im perivaskulären Gewebe detektiert werden. Als Kontrolle dienten Leberschnitte von unbehandelten Hämophilie B Mäusen. Trotz der im Gewebe erkennbaren Autofluoreszenz lässt sich diese aufgrund der diffusen Verteilung deutlich von der Intensität der tatsächlichen FIX Färbung unterscheiden (Abbildung 3.21).



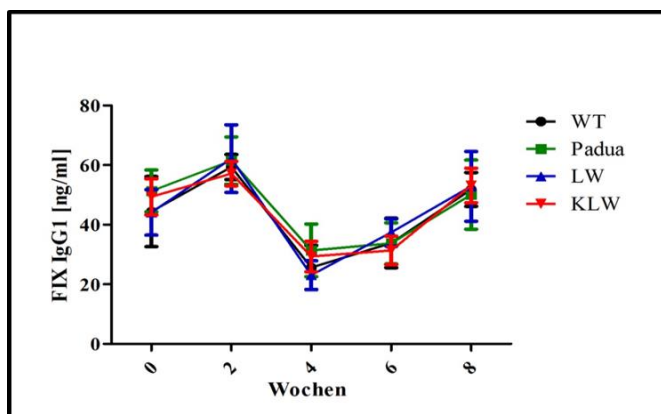
**Abbildung 3.21** Immunhistochemische Untersuchungen von Lebergeweben AAV gentherapierter Hämophilie B Mäuse. Die Zellkerne wurden mit DAPI kenntlich gemacht und FIX emittiert aufgrund des FITC gekoppelten Antikörpers im grünen Spektrum. Wie zu erwarten fand die Transduktion überwiegend im perivaskulären Gewebe statt, ohne sichtbaren Unterschied zwischen den einzelnen Varianten. Die Aufnahmen wurden an einem konfokalen Lasermikroskop der Firma Carl Zeiss in 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstab entspricht 20 µm.

Zusammengenommen wurde in diesem Experiment die Effizienz der hyperaktiven FIX Varianten, insbesondere der LW und K LW Varianten, in einer AAV Gentherapie nachgewiesen. Trotz der bis dato ungeklärten geringeren Expression wiesen die behandelten Tiere signifikant erhöhte Aktivitäten verglichen mit dem Wildtyp auf. Die



erreichten FIX Aktivitäten genügten zudem um den Blutungsphänotyp, ermittelt durch den *Tail Clip Assay*, vollständig zu korrigieren.

Auch während der Gentherapie wurde nochmals die Immunogenität der FIX Varianten im Vergleich zum Wildtyp betrachtet (Abbildung 3.22). Hierzu wurde das Plasma beginnend in Woche Null im zweiwöchigen Abstand auf das Vorhandensein von IgG1 Antikörpern unter Verwendung des FIX IgG1 Antikörper ELISAs analysiert. Die Proben schwankten abermals um den zur Woche Null bestimmten Ausgangswert mit einer Antikörper Konzentration von  $47,47 \pm 3,90$  ng/ml und lagen damit allesamt im immunologisch irrelevanten Bereich. Dies untermauert ebenfalls die zuvor durchgeführte Analyse der unveränderten Immunogenität der Varianten im Vergleich zum Wildtyp.

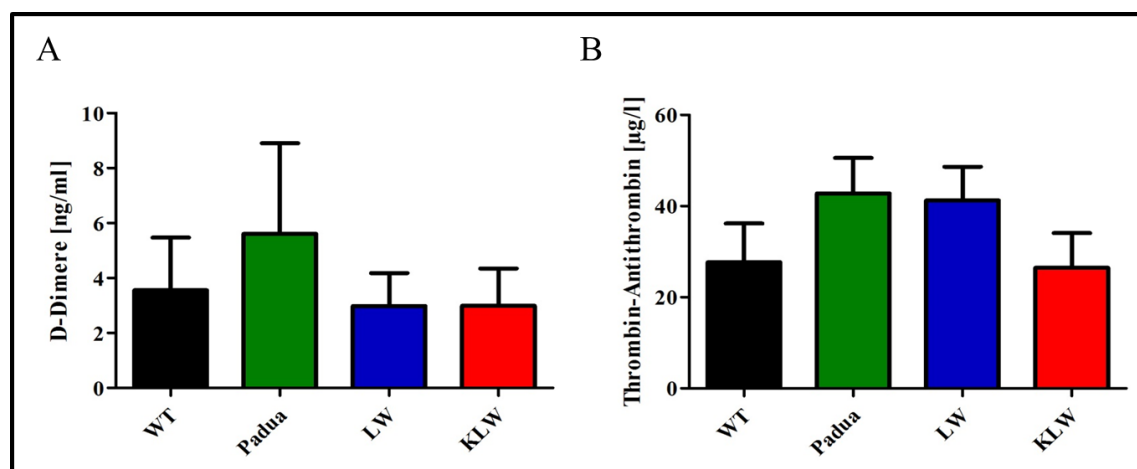


**Abbildung 3.22** Bestimmung der FIX IgG1 Konzentrationen nach Gentherapie von Hämophilie B Mäusen mit  $5 \times 10^{10}$  vg/kg. Die Werte schwanken über den gesamten Zeitraum um den Hintergrund und zwischen den Varianten konnten keinerlei signifikante Unterschiede ermittelt werden.  $n=5$  für WT;  $n=4$  für Padua und LW und  $n=7$  für K LW, MW  $\pm$  SEM, ANOVA, Bonferroni Post-Test.

Während der gesamten Beobachtungszeit kam es auch in der hohen Vektordosis zu keinerlei Verlust eines Versuchstieres, sodass zudem ein vermehrtes Entstehen von klinisch relevanten Thrombosen, ausgelöst durch die Hyperaktivität, ausgeschlossen werden konnte. Dieses Argument wurde zudem durch die Bestimmung von D-Dimeren, sowie dem Thrombin-Antithrombin Gehalt im Plasma von behandelten Mäusen untermauert (siehe Abschnitt 2.9.14). Als Ausgangsmaterial wurde das Plasma von gentherapierten Hämophilie B Mäusen verwendet. Hierbei zeigten sich vergleichbare Konzentrationen an D-Dimeren im Plasma von FIX Wildtyp gentherapierten Mäusen ( $3,55 \pm 1,91$  ng/ml) sowie den drei hyperaktiven Varianten Padua ( $5,61 \pm 3,29$  ng/ml), LW ( $2,98 \pm 1,20$  ng/ml) und K LW ( $2,98 \pm 1,36$  ng/ml) (Abbildung 3.23 A). Ein weiterer klinischer Parameter zur Bestimmung von thrombotischen Ereignissen ist die Analyse des Thrombin-Antithrombin-Komplexes. Aber auch in diesem Fall konnten keinerlei



Unterschiede zwischen dem Wildtyp ( $24,62 \pm 4,58 \mu\text{g/L}$ ) sowie den hyperaktiven Varianten Padua ( $62,65 \pm 4,84 \mu\text{g/L}$ ), LW ( $37,97 \pm 15,58 \mu\text{g/L}$ ) und K LW ( $36,93 \pm 18,55 \mu\text{g/L}$ ) detektiert werden. Die beiden verwendeten Kits wurden allerdings zur Analyse von humanen Plasmen entwickelt und spezifiziert. Aufgrund von inkompletten Kreuzreaktionen mit den murinen Proteinen können die Werte zwar nicht in Relation mit den humanen Standards gesetzt werden, allerdings kann eine Erhöhung der Thrombogenität durch die Verwendung von hyperaktiven Varianten durch den direkten Vergleich zum Wildtyp FIX ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.23** Zur Analyse einer eventuellen Erhöhung der Thromboseneigung durch Verwendung von hyperaktiven Varianten wurden zum einen die Konzentration an D-Dimeren (A), sowie die Thrombin-Antithrombin Konzentration (B) im Plasma von gentherapierten Mäusen mittels kommerziell erhältlicher ELISA ermittelt. Aufgrund der Spezifikation der beiden ELISA für humanes Plasma und möglicher Kreuzreaktionen mit murinen Proteinen sind die tatsächlichen Konzentrationsangaben zwar nicht mit den humanen Normwerten in Beziehung zu setzen, dennoch bestätigte sich keine Erhöhung der Thromboseneigung durch Verwendung einer der drei hyperaktiven Varianten im Vergleich zum Wildtyp. (A)  $n=3$  für WT, Padua und LW;  $n=2$  für K LW. (B)  $n=4$  für WT, Padua und LW;  $n=3$  für K LW, MW  $\pm$  SEM, ANOVA, Bonferroni Post-Test.

## 4 Diskussion

Um eine weitere Reduktion der zurzeit in klinischen Studien gebräuchlichen AAV Dosis zu erzielen wurden im Zuge dieser Doktorarbeit hyperaktive Varianten auf ihr Potential für den Einsatz in der Hämophilie B Gentherapie hin untersucht. Hierzu wurden die FIX Proteine Wildtyp, Padua, LW und K LW erstmals mittels Anionen-Austausch-Chromatographie aufgereinigt und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Charakterisiert. Zur Beurteilung ihres Potentials zur klinischen Weiterentwicklung wurde neben dem pharmakokinetischen Profil auch Aspekte einer gesteigerten Immunogenität sowie Thrombogenität untersucht. Abschließend wurde die tatsächliche Effizienz der hyperaktiven Varianten in einer AAV Gentherapie an Hämophilie B Mäusen in zwei verschiedenen Dosisstufen überprüft.

### 4.1 Generierung und *in vitro* Charakterisierung der Hyperaktiven FIX Varianten

Grundlage, der in diesem Labor generierten hyperaktiven FIX Varianten war die FIX Padua Mutation. Diese wurde erstmals bei einem 23jährigen männlichen Patienten nach einer Venenthrombose diagnostiziert. Genanalysen ergaben eine Substitution der Aminosäure Arginin gegen Leucin an Position 338, welches zu einer 11-fachen Steigerung der FIX Aktivität bei gleichbleibenden FIX Konzentrationen im Plasma führte (196). Bereits 1998 hatten Chang und Kollegen beschrieben, dass eine Substitution an ebendieser Position gegen die Aminosäure Alanin zu einer 3-fach gesteigerten FIX Aktivität verglichen mit dem Wildtyp führte (28). Da diese Position zudem in Säugetieren hoch konserviert vorliegt (39), war deren physiologische Relevanz vorhersagbar gewesen. Die Aktivitätssteigerung kommt durch eine sterische Veränderung der in dieser Region vorliegenden *Exosite* zustande, wodurch zum einen die Bindung an das Substrat FX begünstigt und zum anderen die Affinität für Heparin reduziert wird (21;221). Des Weiteren ist der Kofaktor FVIII für die Aktivitätssteigerung essenziell. Vergleichende Experimente mit dem bi-spezifischen Antikörper Emicizumab als FVIII Ersatz führten zu einer Aufhebung der Hyperaktivität der FIX Padua Variante (184). Demzufolge bleibt auch in den hyperaktiven Varianten

die sterische Umlagerung und die damit verbundene bessere Zugänglichkeit der Substratbindetasche S1 durch die Bindung von FVIII essentiell (195). Aufbauend auf dieser bereits in klinischen Studien gebräuchlichen FIX Padua Variante wurde in diesem Labor durch weitere Aminosäure Substitution die beiden FIX Varianten LW und K LW generiert. Diese sollten zum einen die Aktivität über die Padua Variante hinaus steigern und zum anderen durch eine verminderte Bindung an das extrazelluläre Matrix Molekül Kollagen Typ IV die Bioverfügbarkeit im Plasma erhöhen.

Die Generierung der LW Variante erfolgte durch Substitution der Aminosäure Serin gegen Tryptophan an Position 377. Die Auswahl dieser Mutation erfolgte auf Grundlage der Homologie zu FX an ebendieser Position und der physiologisch höheren Aktivität des Gerinnungsfaktor X im Vergleich zum FIX (133;171). Eine weitere Mutation, die Substitution von Valin gegen Lysin an Position 10, vervollständigte schließlich die K LW Variante, welche neben der gesteigerten Aktivität noch eine verminderte Kollagen Typ IV Bindung aufweist (30) (siehe Abschnitt 3.1.1). Die *in vitro* Charakterisierung und insbesondere die Ermittlung der spezifischen Aktivität zeigte eine 20-fach gesteigerte Aktivität der beiden hyperaktiven Varianten LW und K LW gegenüber dem FIX Wildtyp Protein. Verglichen mit der FIX Padua Variante ergab sich zudem eine Verdopplung der spezifischen Aktivität, wodurch die *in silico* postulierte Aktivitätssteigerung durch die Substitution der Aminosäure Serin gegen Tryptophan an Position 377 bestätigt wurde. Dies steht auch im Einklang mit den zuvor von Quade-Lyssy und Kollegen erhobenen Daten (171).

Da es sich bei den oben genannten *in vitro* Experimenten um Analysen direkt aus dem Zellkulturmedium handelt und andere in den Überstand sezernierte Proteine und Substanzen Einfluss auf die Aktivitätsbestimmung haben könnten sollten die FIX Varianten rekombinant mittels Anionen Austausch Chromatographie hergestellt werden. Darüber hinaus sollten die rekombinanten FIX Varianten *in vivo* zur pharmakokinetischen Charakterisierung eingesetzt werden, wodurch eine Aufreinigung zur Herstellung der erforderlichen Proteinmenge ebenfalls unerlässlich war. Aufgrund vorausgegangener Versuche (Doktorarbeit Daniela Abriss) und Probleme von durch die Aufreinigung verursachten Voraktivierungen der FIX Proteine mussten zunächst Optimierungen am Protokoll selber durchgeführt werden. Dies erfolgte zum einen durch

Anpassung der verwendeten Puffer und zum anderen durch Anpassung des Aufreinigungsprogrammes an der ÄktaPrime (116). Zwar deuteten die mittels naPTT Assay bestimmten reduzierten Gerinnungszeiten der in dieser Arbeit hergestellten FIX Proteinvarianten auf eine Voraktivierung, verursacht durch die Aufreinigung, hin (Abbildung 3.9 B), konnte aber weder durch die Bestimmung der Konzentration aktivierten Proteins im chromogenen Assay (Abbildung 3.9 C) noch durch den Nachweis der FIX Proteine im Western Blot (Abbildung 3.9 D) bestätigt werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die in dieser Arbeit generierten FIX Protein Varianten in nicht-aktiviertem Zustand für weitere Untersuchungen zur Verfügung standen.

Während der Bestimmung der Funktionalität in Hinblick auf die Aktivität der FIX Varianten wurde allerdings die überraschende Entdeckung einer verminderten Expression der hyperaktiven Varianten gemacht (siehe Abbildung 3.3 B). Die Expression ist in diesem Zusammenhang definiert als die pro Vektorkopie hergestellte und sezernierte Proteinmenge. Aus diesem Grund wurden die FIX Proteine hinsichtlich einer möglich veränderten Glykosylierung und/oder einer verminderten Sekretion analysiert. Der Gerinnungsfaktor IX unterliegt einer Vielzahl an posttranslationalen Modifikationen, die zum Teil Einfluss auf die Gerinnungsaktivität haben. Zu den für die Gerinnung unerlässlichen Modifikationen zählen die  $\gamma$ -Carboxylierungen an Glutaminsäureresten innerhalb der Gla Domäne. Diese Modifikation ermöglicht die Kalzium-vermittelte Bindung von FIX an die Membran von aktivierten Plättchen (43). In der EGF1 Domäne von FIX ist neben O-verknüpften Glykosylierungen noch eine weniger verbreitete Modifikation vorhanden, die Hydroxylierung von Asparaginsäure an Position 64. Ein Austausch dieser sauren Aminosäure gegen eine neutrale oder basische führt zu einer verminderten Aktivität von FIX (173). Die meisten posttranslationalen Modifikationen sind hingegen im Aktivierungspeptid zu finden. Neben N- und O- verknüpften Glykosylierungen findet zudem eine Phosphorylierung von Serin an Position 158 und eine Sulfatierung des Tyrosins an Position 155 statt. Die N- und O- verknüpften Glykosylierungen haben an sich keinerlei Einfluss auf die Gerinnungsaktivität, dafür bestimmen sie maßgeblich die Halbwertszeit von Gerinnungsfaktoren im Plasma. Hierbei gilt, je mehr Aminosäuren vorhanden sind, desto mehr Glykosylierungen erfolgen und umso länger ist die Retention des Proteins

im Plasma (95). Weder bei der Padua, noch bei der LW oder K LW Variante sind Glykosylierungsstellen im FIX durch die Mutationen verändert, sodass eine identische posttranslationale Modifikation der Varianten erwartet wurde. Diese Hypothese wurde durch die SDS PAGE untermauert, in der sich keine Größenunterschiede zwischen den Varianten zeigten und somit der Grad der Glykosylierung zumindest quantitativ identisch war (siehe Abbildung 3.8 D). Trotz durchgeführter Massenspektroskopie zur Bestimmung des Reinheitsgrades der aufgereinigten FIX Proteine (siehe Abbildung 3.8 A-C) wurden keine exakteren Analysen weder zum Glykosylierungsstatus noch zu den verschiedenen Glykosylierungsarten in dieser Arbeit durchgeführt. Die Frage nach einer möglicherweise unvollständigen Sekretion erfolgte durch die Inhibierung oder Blockierung von für diesen Prozess notwendigen Zellorganellen. Die Verwendung der Substanz BrefeldinA bewirkt eine Umwandlung des Golgi Apparates zum Endoplasmatischen Retikulum und bringt somit die Protein Sekretion vollständig zum Erliegen (82). In Anwesenheit von BrefeldinA zeigte sich zwar, wie erwartet, eine intrazelluläre Retention der FIX Proteine, allerdings FIX Varianten unspezifisch (siehe Abbildung 3.5). Auch die durch Ammoniumchlorid vermittelte Inhibierung des lysosomalen Transports führte für alle Varianten gleichermaßen zu einer verminderten Sekretion. Der Einsatz von clasto-Lactacystin  $\beta$ -lacton (46) zur Blockierung der Proteasomen sollte schließlich Aufschluss über eine eventuell vorliegende erhöhte Degradation der mutierten Proteine geben. Auch hier ergaben sich keine Anhaltspunkte für einen Unterschied zwischen den FIX Varianten. Von Kurachi und Kollegen durchgeführte Mutationsstudien lokalisierten die C-terminale Region, insbesondere die Aminosäuren 403-415, des FIX Proteins als maßgeblich für die Sekretion (108). Da keine der in dieser Arbeit untersuchten FIX Varianten Mutationen in diesem Sequenzbereich aufweisen war mit einer zum WT abweichenden Sekretion nicht zu rechnen. Dadurch, dass weder die Glykosylierung noch der intrazelluläre Transport oder die Sekretion der mutierten FIX Varianten einen Unterschied zum WT Protein aufwiesen ist der Effekt der verminderten Expression der hyperaktiven Varianten vermutlich bereits im Zuge der Translation, wenn nicht sogar der Transkription zu suchen. Ein Hinweis könnte hierbei die Frequenz, beziehungsweise die Bevorzugung, von bestimmten Aminosäuren, sowie deren Zusammensetzung in der Proteinsequenz selber sein. Otaki und Kollegen konnten zeigen, dass *in vivo* bestimmte Aminosäuren

und Kodon Zusammensetzungen bevorzugt Verwendung finden (160), und dadurch die Translation per se eingeschränkter von statten geht. Auch *In vitro* könnte die Zusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums ein Indiz auf die verringerte Expression der hyperaktiven FIX Varianten sein. So ist beispielsweise die Aminosäure Tryptophan mit nur 16 mg/ml in geringerer Konzentration im verwendeten Medium vorhanden und könnte daher ebenfalls einen limitierenden Schritt in der Translation der hyperaktiven Varianten darstellen (ATCC® 30-2002).

## 4.2 Erhöhung der Immunogenität durch Einzelnukleotid Austausch der FIX Varianten

Die Entwicklung von inhibitorischen Antikörpern gegen infundierte Proteine, wie beispielsweise FIX, wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Grob kann hierbei zwischen genetischen und behandlungsbedingten Faktoren differenziert werden. Zu den genetischen Faktoren zählen neben dem ethnischen Ursprung des Patienten auch die zugrunde liegende Mutation im endogenen FIX Gen (71;72). Die häufigste Mutation für die Entwicklung der Hämophilie B ist die *Missense* Mutation. Bei dieser Mutation entsteht zwar nicht funktionelles FIX Protein, welches allerdings für die Körperinterne Erkennung als nicht Fremdprotein ausreichend ist, so dass bei nur etwa 1% dieser Patienten inhibitorische Antikörper nach Substitutionstherapie auftreten. Wohingegen Patienten mit einer zugrunde liegenden *Nonsense* oder *Deletions* Mutation wegen der relativ großen immunologischen Diversität des endogenen FIX-Proteins mit der wildtypischen Variante erwartungsgemäß ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Antikörpern aufweisen (180). Von konkreter Bedeutung in dieser Arbeit ist allerdings eine mögliche Erhöhung der Immunogenität durch den Austausch von Nukleotiden und der einhergehenden Veränderung der Aminosäure. Dass diese nichtsynonymen Einzelnukleotid Austausche durchaus eine immunologische Relevanz aufweisen wurde von Viel und Kollegen demonstriert. In einer vergleichenden Studie wurden bei Hämophilie A Patienten mit afrikanischem Ursprung Einzelnukleotid Polymorphismen entdeckt, welche mit einer erhöhten Neigung zur Antikörper Entwicklung korrelieren (207). Andererseits schützen, wie oben diskutiert, funktionslose *Missense* Mutationen im FIX im klinischen Alltag durchaus signifikant vor einer Immunisierung und Ausbildung von Inhibitoren. Aufgrund dessen wurden auch die hier im Labor generierten hyperaktiven Varianten auf eine erhöhte Immunogenität verglichen mit dem WT Protein hin untersucht. Die Immunogenität wurde hierzu in zwei unterschiedlichen Ansätzen untersucht: die Injektion von rekombinantem FIX in den *Musculus quadriceps* und die subkutane Injektion von rekombinanten FIX Varianten in Kombination mit dem inkompletten Freundschens Adjuvans. Die alleinige Injektion von rekombinantem Protein in den Muskel war daher nicht ausreichend, um in Hämophilie B Mäusen eine Immunantwort zu provozieren (siehe Abbildung 3.10). Im Gegensatz zur Injektion von

rekombinantem Protein führt die AAV Injektion in den Muskel zu einer humoralen und zellulären Immunantwort, nicht nur gegen das AAV Kapsid, sondern auch gegen das Transgen selber (3;16;24). Hierbei spielt das angeborene Immunsystem, vermittelt über den TLR9 Rezeptor, sowie das erworbene Immunsystem durch die Aktivierung des MyD88 Signalweges eine entscheidende Rolle (84;224). Des Weiteren sind die unmethylierten CpG Motive mit bakteriellem Ursprung in den verwendeten Plasmiden von entscheidender Bedeutung in dem sie sich ähnlich wie ein Adjuvans verhalten und somit eine Immunantwort potenzieren (106). Daher war die Verwendung eines Adjuvans zur Verstärkung der Immunogenität unerlässlich. Die Kombination aus Paraffinöl und Tensiden, als Bestandteile des inkompletten Freundschens Adjuvans, übt durchaus immunologische Effekte auf das Immunsystem aus. Es konnte nicht nur ein Effekt auf das angeborene Immunsystem nachgewiesen werden (26), sondern auch die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, vorwiegend von  $\text{TNF}\alpha$  (146). Zudem scheint auch die Bildung von Sauerstoffradikalen zur Induktion einer Immunantwort beizutragen (45). Im Gegensatz zum kompletten Freundschens Adjuvans, mit zugesetzten Mykobakterien, handelt es sich zudem bei der Reaktion auf das inkomplette Freundsches Adjuvans überwiegend um eine humorale statt eine zelluläre Immunantwort (80;222). Die subkutane Injektion der rekombinanten FIX Proteine in Kombination mit dem inkompletten Freundschens Adjuvans führte letztendlich zu einer drastischen Immunantwort in Hämophilie B Mäusen (siehe Abbildung 3.11). Bereits nach der ersten Injektion konnte ein Anstieg an IgG1 Antikörpern in den Plasmen verzeichnet werden, welcher zudem nach der zweiten Injektion potenziert wurde. Gleichmaßen konnte mittels Bethesda Assay das Vorhandensein von inhibitorischen Antikörpern nachgewiesen werden. Aber auch nach erfolgreicher Induktion einer Immunantwort in Hämophilie B Mäusen konnte zwischen den hyperaktiven Varianten, sowie dem Wildtyp FIX und sogar dem kommerziell erhältlichen BeneFIX® kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Eher ließ sich eine tendenziell schwächer verlaufende humorale Immunantwort in den mit den hyperaktiven Varianten behandelten Hämophilie B Mäusen beobachten. Dies konnte bereits in anderen Studien unter Verwendung der Padua Variante und Analyse der Immunogenität bestätigt werden (28;38;54). Um allerdings nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ eine gleichbleibende Immunogenität der FIX Varianten zu bestätigen müssten weitere



immunologische Experimente durchgeführt werden. So wäre beispielsweise eine vorab durchgeführte Toleranzinduktion gegen wildtypischen FIX mittels AAV Gentherapie oder hydrodynamischer Injektion und nachfolgender Injektion der FIX Varianten in den Muskel oder subkutan eine Möglichkeit gezielt Variantenspezifische Immunreaktionen zu identifizieren.

### 4.3 Einfluss der verminderten Kollagen Typ IV Bindung auf die Pharmakokinetik von FIX

Die Kollagen Typ IV verminderte Mutation wurde bereits 1992 von Cheung und Kollegen beschrieben. Die Forscher mutierten hierbei verschiedene Aminosäuren innerhalb der Gla Domäne, um die Bindung von FIX an Endothelzellen weiter zu spezifizieren. Hierbei konnten sie zeigen, dass Austausche der Aminosäuren Lysin zu Alanin an Position 5 oder von Valin gegen Lysin an Position 10 die Bindung von FIX an Kollagen Typ IV reduzieren. Interessanterweise bewirkt eine Aminosäure-Substitution von Lysin zu Arginin an Position 5 den gegenteiligen Effekt (30). Analog zu den Arbeiten von Cheung et al. konnte auch in dieser Arbeit die reduzierte Bindung an Kollagen Typ IV durch die V10K Mutation gezeigt werden (siehe Abbildung 3.12). Die pharmakokinetische Analyse erfolgte zum einen nach subkutaner und zum anderen nach einer intravenösen Injektion von rekombinanten Proteinen in Hämophilie B Mäusen. In beiden Ansätzen zeigte sich eine deutlich erhöhte Bioverfügbarkeit der KLV Variante im Vergleich zum Wildtyp FIX und den anderen beiden hyperaktiven Varianten LW und Padua. Bei der intravenösen Injektion konnten beim Wildtyp, sowie bei den hyperaktiven Varianten Padua und LW nur 20% des infundierten FIX im Plasma nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.14), welches im Einklang mit anderen pharmakokinetischen Studien in Mäusen steht (19;61;76). Der größte Bestandteil des infundierten FIX Proteins wird offenbar am ubiquitär im Bindegewebe exprimierten Kollagen Typ IV immobilisiert und steht für die Hämostase nicht zur Verfügung. Bei der KLV Variante hingegen konnten nach intravenöser Injektion aufgrund der verminderten extrazellulären Sequestrierung noch 60% der ursprünglich infundierten Menge an FIX im Plasma der Mäuse nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.14). Dieser Effekt der extravaskulären FIX Bindung an Kollagen Typ IV konnte nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* in weiteren externen Studien gezeigt werden. Stern und Kollegen zeigten bereits die extravaskuläre Speicherung von FIX und die daraus resultierende Bedeutung für FIX Infusionen (201). Die intravenöse Injektion von aus Rindern gewonnenem FIX in Affen zeigte im Verlauf der Kinetik eine zuerst drastische Reduktion der infundierten Menge an Rinder FIX mit zeitgleicher Zunahme der Menge an Affen FIX im Plasma. Schlussfolgernd muss es zu einer Verdrängung des extravaskulär gespeicherten Affen

FIX durch den infundierten, aus Rindern gewonnenen, FIX gekommen sein (201); die Daten zeigen auch, dass offenbar die Kollagenbindungsstellen für FIX gesättigt sind, und der zirkulierende FIX der keine Bindungsstelle an Kollagen mehr findet als überschüssig betrachtet werden kann. Gleichzeitig zeigten Analysen von Fuchs und Kollegen und Stern und Kollegen mittels radioaktiv markiertem FIX, dass der bevorzugte Ort der extravaskulären FIX Speicherung in der Leber vorliegt, kleinere Mengen wurden darüber hinaus noch in der Niere, der Milz und in der Lunge lokalisiert (61;201). Dass die Leber der bevorzugte Ort der extravaskulären Speicherung ist, wurde zudem auch von Gui und Kollegen demonstriert. Diese zeigten, dass 80% von infundiertem FIX nur zwei Minuten später in der Leber zu detektieren war und, dass eine Unterbrechung der Leberzirkulation die Konzentration an FIX im Plasma nach Infusion deutlich erhöhte (76). Dieser Effekt wirkt sich natürlich auch auf die Substitutionstherapie bei Menschen aus. Hier konnte gezeigt werden, dass bei *cross reactive material* positiven Hämophilie B Patienten deutlich mehr FIX im Plasma nach intravenöser Injektion zu detektieren ist als in *cross reactive material* negativen Patienten (Briet, 1977; Thesis: Three problems of hemophilia B). Angenommen wird hierbei ebenfalls eine Sättigung der extravaskulären Bindungsstellen für FIX.

Trotz der erhöhten Bioverfügbarkeit zeigte sich allerdings auch eine beschleunigte Eliminierung der K LW Variante sowohl nach subkutaner, als auch intravenöser Injektion und der daraus resultierenden Reduktion der Halbwertszeit (siehe Abbildung 3.13 und 3.14). Die in dieser Studie ermittelten Halbwertszeiten für die Elininierungsphase lagen beim WT FIX sowie der Padua und LW Variante bei circa zwei Stunden. Im Vergleich mit externen Studien und sogar unterhalb der externen Studien variieren die errechneten Halbwertszeiten stark und sind zum einen von der verwendeten Spezies, als auch von den zur Berechnung herangezogenen Zeitpunkten abhängig (76). Auch die Auswahl des geeigneten Modellsystems zur Berechnung ebendieser Parameter spielt eine entscheidende Rolle. Im Allgemeinen wird zur pharmakokinetischen Berechnung der FIX Substitution das Zwei Kompartimenten Modell verwendet, welches die Verteilung zwischen den beiden Kompartimenten Plasma und Extravaskularraum mit einbezieht (13). Charakterisiert ist dieses Modell durch eine rasch verlaufende Sequestrierung des infundierten FIX Proteins in den Extravaskularraum und einer darauffolgenden langsameren Eliminierung des FIX

Proteins aus dem Plasma. Unter welchem Mechanismus FIX aus dem Vaskularsystem eliminiert wird, ist bis heute nicht vollends aufgeklärt, diskutiert wird eine Interaktion mit dem Asialoglykoprotein Rezeptor (14) und der damit verbundenen Internalisierung und Degradierung des FIX Proteins in Hepatozyten. Auch eine Interaktion zwischen aktiviertem FIX und dem *low-density lipoprotein-related protein 1* (LRP1) wurde beschrieben, konnte allerdings *in vivo* ebenfalls nicht als der Eliminierungsmechanismus bestätigt werden (155). Selbst eine Eliminierung von FIX über die Kollagen Typ IV Bindung wurde diskutiert (64). Allerdings scheint die Kollagen Typ IV Bindung eher gegenteilig als biologische Verlängerung der Halbwertszeit von FIX im Plasma zu fungieren, ähnlich wie der von Willebrand Faktor für den Gerinnungsfaktor VIII (204). Dies ist auch klar aus der pharmakokinetischen Charakterisierung der KLV Variante in dieser Arbeit zu entnehmen (siehe Abbildung 3.13 und 3.14). Unterstützt wird diese Behauptung zudem durch die K5A Variante, welche ebenfalls eine verminderte Bindung an Kollagen Typ IV aufweist. Diese zeigte gleichfalls eine erhöhte Bioverfügbarkeit allerdings ebenso eine Reduktion der Halbwertszeit (76). Die Kombination der KLV Variante mit Halbwertszeit verlängernden Modifikationen könnte dem Problem der schneller verlaufenden Eliminierung entgegenwirken. Eine Methode zur Verlängerung der Halbwertszeit ist die kovalente Bindung des jeweiligen Gerinnungsfaktors an Polyethylenglykol, kurz PEGylierung genannt. In dieser Technik wird CMP-aktivierte und PEGylierte Sialinsäure mit Hilfe des Enzyms ST3 beta-Galactoside-alpha-2,3-Sialyltransferase 3 an terminale Galaktosen von N-Glykanen, lokalisiert in den beiden Asparagin Aminosäuren im Aktivierungspeptid, gebunden. Durch Optimierungsprozesse der Reaktionsbedingungen findet die PEGylierung hierbei vornehmlich nur an einer der beiden Aminosäuren statt, wobei die Verteilung untereinander rein zufällig und stöchiometrisch identisch ausfällt (159). Die Gerinnungsdiagnostik zeigte eine gleichbleibende Aktivität des modifizierten Proteins mit zugleich drastisch verlängerter Halbwertszeit (159). Die verlängerte Halbwertszeit wird hierbei simpel durch eine Vergrößerung des Proteins und damit einhergehend eine geringere renale Ausscheidung erzielt (165). Eine weitere Verlängerung der Halbwertszeit von Gerinnungsfaktoren wird durch die Fusion mit Proteinen erzielt, welche von Natur aus bereits eine deutlich längere Halbwertszeit aufweisen. Grundlage ist das über den Neonatalen Fc Rezeptor

vermittelte Recycling von Proteinen und eine Verhinderung der lysosomalen Degradation (29;192). Die derart modifizierten FIX Wildtyp Proteine wurden bereits in klinischen Studien in Hinblick auf ihre Effizienz sowie Sicherheit hin untersucht. Durch die Fusion von FIX mit dem Fc Anteil von Immunglobulinen konnte in einer Phase 3 Studie bereits eine 2,4-fach verlängerte Halbwertszeit erreicht werden, einhergehend mit einer Reduktion der Infusionsintervalle. Zugleich konnte aufgrund der verlängerten Halbwertszeit die Periode mit einer FIX Aktivität über 1% auf bis zu 14 Tage ausgedehnt werden. Dies zeigte auch die Reduktion der spontanen Blutungsereignisse um bis zu 90%. Während des Beobachtungszeitraumes konnten zudem keine inhibitorischen Antikörper gegen den infundierten rFIXFc nachgewiesen werden (167). Ähnlich verhielt es sich auch mit einer Phase 3 Studie zur Effizienz und Sicherheit des FIX-Albumin Fusionsproteins. Durch eine nochmals verlängerte Halbwertszeit bis zu 102 Stunden konnten die Infusionsintervalle ebenfalls auf bis zu zwei Wochen ausgedehnt werden ohne dabei das Auftreten von spontanen Blutungen zu provozieren (186;187). Eine Besonderheit zeigte sich in der Pharmakokinetik des PEGylierten FIX mit einer gesteigerten Bioverfügbarkeit nach intravenöser Injektion in Hämophilie B Patienten (34). Dies wurde zuvor auch in *in vitro* Studien beobachtet, in denen 20-fach mehr an PEGyliertem FIX aufgewendet werden musste, um radioaktiv markierten FIX von HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) Zellen zu verdrängen (159). Zwar wurde auch mittels PEGylierung eine Halbwertszeit Verlängerung um das 4,8-fache erzielt, dennoch konnten spontan auftretende Blutungen in einer Vielzahl von behandelten Patienten beobachtet werden und das obwohl sich die gemessenen FIX Aktivitäten stets über den Schwellenwert von 1% befanden (34). Die Studie von Collins und Kollegen könnte daher ein weiteres Indiz auf eine physiologische Bedeutsamkeit der extravaskulären Speicherung von FIX sein, was aber nach wie vor eingehender untersucht werden müsste (163). Die Verwendung von Fc oder Albumin gekoppeltem FIX Wildtyp Protein in der Gentherapie wurde ebenfalls in Betracht gezogen. Allerdings zeigte der Einsatz von Fc- oder Albumin-gekoppelten FIX eine zu geringe Expression nach Gentherapie in Hämophilie B Mäusen, sodass dieser Ansatz vorerst nicht weiter verfolgt wurde (110). Neben der gängigen Form der intravenösen Substitutionstherapie wäre die Entwicklung neuer Therapieansätze mittels subkutaner Injektion denkbar. Das Potential dieser Form der Therapie zeigt eine zurzeit

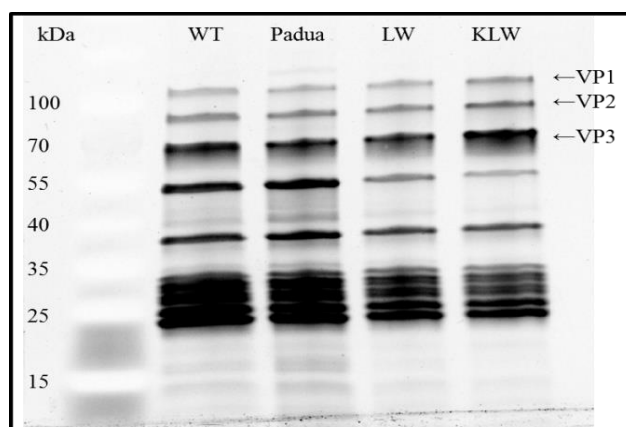
durchgeführte Phase 2b Studie mit FIX Dalcinonacog alpha (NCT03995784). Mit der täglichen subkutanen Injektion von 100IU/ml in Hämophilie B Patienten konnten FIX Aktivitäten von maximal 27% erreicht werden. Interessanterweise wiesen auch die Talspiegel stets über 12% FIX Aktivität auf, sodass eine Korrektur von einer schweren Verlaufsform zu einer milden Hämophilie erreicht wurde (NCT03995784). Unter dem Medikamentennamen Dalcinonacog alpha verbirgt sich eine 3-fach mutierte Variante des Gerinnungsfaktors IX, ähnlich der K LW Variante aus dieser Doktorarbeit. Die 17-fach gesteigerte Aktivität wurde allerdings durch den Austausch der Aminosäure Arginin gegen Glutaminsäure an Position 338, sowie die Substitution von Threonin zu Arginin an Position 343 erzielt. Als Zusatz wurde zudem noch durch den Austausch der Aminosäure Arginin zu Tyrosin an Position 318 eine verminderte Inaktivierung durch Antithrombin erzielt (Hong et al., 2017; EAHAD Abstract). Pharmakokinetische Analysen von Dalcinonacog alpha in Minischweinen zeigten eine erhöhte Aktivität aufgrund der Mutationen, ansonsten aber ein identisches pharmakokinetisches Profil im Vergleich zum BeneFIX® (Hong et al., 2017; EAHAD Abstract). Daher bietet die in dieser Arbeit charakterisierte K LW Variante mit der erhöhten Bioverfügbarkeit nach subkutaner Injektion eine bessere Alternative zur Etablierung einer zur Gentherapie alternativen Hämophilie B Behandlung. Dennoch wäre die Erweiterung der K LW Variante mit der Antithrombin inhibierenden Mutation denkbar.

#### 4.4 Effizienz hyperaktiver FIX Varianten in der AAV Gentherapie

Die Gentherapie der Hämophilie B zeigte in den vergangenen Jahren stetige Fortschritte. So konnte unter Verwendung eines Kodon optimierten FIX als Transgen eine Expression von 1-6% in Hämophilie B Patienten erreicht werden (153). Allerdings zeigte sich in behandelten Patienten, insbesondere in der hohen Dosisstufe, ein Anstieg an Transaminasen mit einhergehender Reduktion oder sogar dem totalen Verlust der bis dato erzielten FIX Expression (152). Eine später durchgeführte klinische Studie unter Sponsorschaft der Firma uniQure erreichte ähnliche FIX Expressionen von 4-7% (132). Auch in dieser Studie konnte ein Transaminasenanstieg verzeichnet werden, allerdings ohne Nachweis von zytotoxischen T Zellen und dem damit verbundenen Verlust der FIX Expression. Zum einen wurde hierbei die Verwendung eines potentiell geringer immunogenen AAV des Serotyps 5 diskutiert (40;51;132;172), zum anderen wäre möglicherweise der Transaminasenanstieg ohne Expressionsverlust im Sinne einer Stressreaktion transduzierter Hepatozyten zu interpretieren, verursacht durch eine aufs perivaskuläre Umfeld beschränkten Transduktion der Hepatozyten und der damit einhergehenden Überbelastung durch die immens gesteigerte Proteinexpression (132). Der Einsatz von hyperaktiven FIX Varianten in der AAV Gentherapie könnte zweierlei Vorteile bieten. Zum einen kann die Reduktion der Vektordosis das Auftreten von Immunreaktionen minimieren, darüber hinaus kann der zelluläre Stress für die transduzierten Hepatozyten vermindert und trotzdem eine ausreichend hohe FIX Aktivität erzielt werden. So führte die Verwendung der Padua Mutation in einer AAV Gentherapie Studie der Firma Spark bereits zu einer durchschnittlichen FIX Expression von bis zu 34%, aber auch in dieser Studie konnte ein Anstieg an Transaminasen inklusive Aktivitätsverlust in einigen Patienten, insbesondere in der hohen Vektordosis, beobachtet werden (69). Somit ist es weiterhin das Ziel die zu verwendende Vektordosis zu minimieren um das Auftreten von Lebertoxizitäten jedweden Ursprungs zu verhindern.

Die in dieser Arbeit erstmalig rekombinant hergestellten und *in vitro* charakterisierten hyperaktiven Varianten wurden daraufhin auch auf ihr Potential für den Einsatz in der

Hämophilie B Gentherapie hin untersucht. Die AAV Partikel des Serotyps 8 mit der jeweiligen FIX Variante als Transgen und unter der Kontrolle des Leberspezifischen LP1 Promoters wurden in einer niedrigen Dosisstufe ( $5 \times 10^{10}$  vg/kg) und in einer hohen Dosisstufe ( $2 \times 10^{11}$  vg/kg) Hämophilie B Mäusen injiziert, um zum einen die Effizienz der Varianten, zum anderen ihre Sicherheit zu beurteilen. Auffällig ist in beiden Dosisstufen die, trotz vorab durchgeführter Titrierung und Begutachtung der Viruspartikel mittels SDS PAGE, schwankende Vektorkopienzahl zwischen den einzelnen Varianten (siehe Abbildung 3.15 A und 3.18 A). Nach Auftragung der Viruspartikel auf einem SDS Gel konnten neben den klar zu erkennenden Hüllproteinen VP1-3 Verunreinigungen nachgewiesen werden (Abbildung 4.1). Bei der Aufreinigung mit dem von der Firma Takara bezogenen Kit (AAVpro® purification Kit) handelt es sich überwiegend um eine reine Aufkonzentration der Viruspartikel. Die eigentliche Methode der Präparation von AAV Partikeln erfolgt mittels Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation, welche zwar Aufwändiger ist aber reinere Viruspartikel generiert.



**Abbildung 4.1:** SDS Page zuvor aufgereinigter AAV Partikel. Aufgetragen wurden jeweils  $5 \times 10^9$  Vektorgenome. Gut zu erkennen sind die drei Hüllproteine VP1, VP2 und VP3, allerdings auch weitere Verunreinigungen.

Zudem konnte mit einer kürzlich durchgeführten Studie belegt werden, dass alleine die Bestimmung der AAV Partikel mittels qPCR keine Differenzierung zwischen infektiösen und nicht infektiösen Viruspartikeln erlaubt (60). Somit wäre eine vorab durchgeführte *in vivo* Titrierung der Partikel unerlässlich gewesen, um den tatsächlichen Gehalt an infektiösen versus nicht infektiösen AAV Partikeln zu bestimmen und eine weitgehend identische Transduktionseffizienz und folglich Vektorkopienzahlen zu erzielen. Bei der Betrachtung der ermittelten FIX Konzentration mittels FIX ELISA in



den Plasmen der AAV gentherapierten Mäuse, sowie nach der Normalisierung dieser auf die Vektorkopienzahl, wurde eine verminderte Expression aller hyperaktiven Varianten im Gegensatz zum FIX Wildtyp verzeichnet (siehe Abbildung 3.15 C und 3.18 C). Somit konnte auch eine unvorteilhafte Insertion der lentiviralen Partikel in den Einzelzellklonen der hyperaktiven FIX Varianten ausgeschlossen werden. Diese Annahme war zudem recht unwahrscheinlich, da die Insertion von Lentiviren nicht alleine von der Zugänglichkeit des Chromatins, sondern auch von DNA bindenden Proteinen, sowie dem aktuellen Status des Zellzyklus abhängig ist und alles zusammen genommen stöchiometrisch höchst unwahrscheinlich wäre (32). Die geringere Expression von FIX Varianten, inklusive der FIX Padua Variante, konnte vorab auch in anderen Studien beobachtet werden (111;162). Allerdings konnte die dortige Beobachtung einer Anreicherung von intrazellulärem FIX Padua Protein nach Inhibierung der Lysosomen mittels Ammoniumchlorid in dieser Arbeit nicht reproduziert werden wobei bislang nur hypothetisch ein degradierender intrazellulärer Transport über das endosomale Kompartiment angedacht wurde, dies konnte aber weder in der Arbeit von Le Quellec und Kollegen, noch in dieser Arbeit nachvollzogen werden (111).

Doch trotz der geringeren Expression der hyperaktiven Varianten zeigte die Bestimmung der FIX Aktivität mittels aPTT und chromogenen Assay sowohl in der hohen als auch in der niedrigen Dosis eine deutliche Hyperaktivität der FIX Varianten im Gegensatz zum FIX Wildtyp Protein (siehe Abbildung 3.16 A und 3.19 A). Anzumerken ist hierbei auch die in dieser Doktorarbeit beobachtete Diskrepanz zwischen der Verwendung des aPTT Assay sowie des chromogenen Assays zur Bestimmung der FIX Aktivität. Die ermittelten FIX Aktivitäten mittels chromogenem Assay liegen circa 30% unter der mittels aPTT Assay bestimmten FIX Aktivität (216). Was genau Ursache dieser Beobachtung ist, ist nach wie vor nicht aufgeklärt (23;69;185). Neben der Auswahl des geeigneten Assays zur Bestimmung der FIX Aktivität scheint auch die Hyperaktivität von FIX Varianten zu Diskrepanzen zu führen wie George und Kollegen in einer AVV Gentherapie Studie zeigen konnten (69). Dies könnte durchaus zu einer Fehleinschätzung der tatsächlichen FIX Padua Aktivität im Plasma führen. Möglicherweise könnten Kalibrationskurven, angefertigt aus rekombinanten FIX Padua Protein, bei der Aktivitätsbestimmung unterstützen (183).

Dass sich diese Unterschiede in der Aktivitätsbestimmung nicht allein auf die Padua Variante beziehen lassen, zeigte eine erst kürzlich durchgeführte vergleichende Studie mit Dalcinonacog alpha. Hierbei zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede in der Aktivitätsbestimmung mittels aPTT und chromogenem Assay. Darüber hinaus wurden zudem Unterschiede bei der Verwendung von verschiedenen aPTT Reagenzien beobachtet (215). Die Berechnung der spezifischen FIX Aktivität ergab erneut eine circa 5-fache Steigerung der Padua Variante gegenüber dem Wildtyp und eine bis zu 14-fache Steigerung der LW beziehungsweise K LW Variante (siehe Abbildung 3.16 B und 3.19 B). Die *in vivo* beobachtete 5-fache Steigerung der Padua Variante erreichte zwar nicht die *in vitro* beobachtete 8-10-fache Steigerung, sowie der in dem ursprünglichen Patienten diagnostizierten 8-fachen Steigerung der FIX Aktivität, wurde allerdings in weiteren Gentherapie Studien in Mäusen ebenfalls beobachtet und bestätigt (23;98;111;141;147). Eine hypothetische Überlegung diesbezüglich könnten Kreuzreaktionen zwischen den murinen plasmatischen Proteinen und den humanen Testseren, sowohl beim aPTT also auch beim chromogenen Assay, sein. Hiermit ließe sich ebenfalls die *in vitro* beobachtete 20-fach erhöhte spezifische Aktivität der LW und K LW Variante gegenüber dem Wildtyp auf eine nur 14-fach gesteigerte Aktivität *in vivo* erklären.

Die erreichten FIX Aktivitäten waren dennoch allesamt ausreichend um den Blutungsphänotyp der Hämophilie B Mäuse in einem *Tail Clip Assay* vollständig zu korrigieren, wobei nach Gabe der niedrigen Dosis Wildtyp-kodierender AAV Partikel eine leicht erhöhte Blutungsneigung verglichen mit den hyperaktiven Varianten zu verzeichnen war (siehe Abbildung 3.17). Die Beobachtung, dass die K LW Variante mit der verminderten Bindung an Kollagen Typ IV eine funktionelle sekundäre Hämostase aufwies, widerlegt die Behauptung von Gui und Kollegen, dass Kollagen Typ IV im Zusammenspiel mit FIX eine kritische Relevanz in der Hämostase besitzt (77). Die verminderte Bindung an Kollagen Typ IV war in dieser Studie Folge der Substitution der Aminosäure Lysin gegen Alanin an Position 5 in der Gla Domäne des FIX Proteins. Die Untersuchung der Blutungsneigung ergab dann letztendlich zwar eine Reduktion, allerdings keine vollständige Korrektur der Blutungsdauer auf das Niveau von mit FIX Wildtyp behandelten Mäuse (77). Allerdings zeigten Strukturanalysen dass ebendiese Aminosäure an der Bindung von Phosphatidylserin auf der Oberfläche von aktivierten

Plättchen beteiligt ist, wodurch eine andere Interpretation ihrer Ergebnisse in den Fokus gerückt ist (1). Untermuert wird die Begründung der verminderten Bindung an Phosphatidylserin dadurch, dass zum einen das Vorkommen einer positiv geladenen Aminosäure an dieser Position hoch konserviert ist, und zum anderen, dass die Substitution gegen die negativ geladene Glutaminsäure in einem Patienten zu einer schweren Hämophilie B führte (179).

Somit konnte die Effizienz der hyperaktiven Varianten in der AAV Gentherapie gezeigt werden, wobei die Aminosäure Substitution von Serin gegen Tryptophan an Position 377 nochmals eine weitere Aktivitätssteigerung gegenüber der Padua Variante aufweist, sodass mit Verwendung der LW und auch K LW Variante eine weitere Reduktion der Vektordosis ermöglicht werden kann. Wobei die K LW Variante, wie bereits in Abschnitt 4.3 diskutiert, ihr Potential vielmehr in der Substitutionstherapie entfalten kann.

Neben der Effizienz wurden auch in den AAV-Gentherapie Experimenten die Aspekte der Immunogenität sowie Thrombogenität durch den Einsatz von hyperaktiven FIX Varianten begutachtet. Die Thrombogenität spielt insofern eine Rolle, als die Entdeckung der Padua Variante nach Gerinnungsdiagnostik in einem jungen männlichen Patienten mit einer spontanen Venenthrombose im Bein erfolgte (196). Thrombogenität und Immunogenität wurden bereits mehrfach in präklinischen Studien an Mäusen und Hunden untersucht. Hierbei zeigten sich selbst bei Erreichen von supraphysiologischen FIX Aktivitäten von bis zu 500% keinerlei prothrombotische Effekte und bislang konnten keine inhibitorischen Antikörper gegen FIX als Transgen nach AAV Gentherapie in der Leber nachgewiesen werden (23;54;141;147). Selbst unter Verwendung von zusätzlichen aktivitätssteigernden Mutationen wie in der V86A/E277A/R338L Variante konnten weder makroskopisch noch mikroskopisch thrombotische Ereignisse nachgewiesen werden (98). Dies konnte auch in dieser Arbeit durch die Analyse von D-Dimeren, sowie dem Thrombin-Antithrombin Komplex bestätigt werden. Beide Faktoren sind sensitive Marker einer Gerinnungsaktivierung und waren bei FIX-Varianten-behandelten Mäusen unauffällig (siehe Abbildung 23 A und B). Zudem ist anzumerken, dass ausschließlich beim ursprüngliche Padua Patienten Venenthrombosen aufgetreten sind, wohingegen der Bruder mit derselben Mutation sowie die heterozygote Mutter bislang beschwerdefrei geblieben sind (196).

Der Aspekt einer möglichen gesteigerten Immunogenität wurde bereits in Abschnitt 4.2 nach Injektion rekombinanter FIX Proteinvarianten diskutiert. Nochmals kurz zusammengefasst zeigte sich weder nach intramuskulärer noch subkutaner (sublimiert mit inkompletten Freundschem Adjuvans) Injektion von rekombinanten FIX Proteinvarianten eine Erhöhung der Immunogenität im Vergleich zum FIX WT Protein (siehe Abbildung 3.10 und 3.11). Diese Beobachtung konnte zudem nochmals in der Analyse der Menge an gebildeten IgG1 Antikörpern gegen FIX als Transgen nach erfolgter AAV Gentherapie bestätigt werden (siehe Abbildung 3.22). Vielmehr konnte nach erfolgter AAV Gentherapie keinerlei Immunreaktion gegen FIX als Transgen nachvollzogen werden, welches maßgeblich durch die toleranzinduzierende Eigenschaft der Leber selber vermittelt wird. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Injektion des Gleichen AAVs, mit FIX als Transgen, in den Muskel von Hämophilie B Mäusen eine Immunantwort provoziert hatte und keinerlei FIX Expression im Mausplasma zu detektieren war, wohingegen die Administration mit der Leber als Zielgewebe keine humorale Immunantwort gegen das Transgen FIX ausgelöst hatte (67). Die Toleranzinduktion wird überwiegend durch sogenannte regulatorische T Zellen (Tregs) vermittelt, die über verschiedene Mechanismen direkt und indirekt Antigen präsentierende Zellen, B Zellen und T Effektor Zellen supprimieren (127;139;140;181;182;220). Innerhalb der Leber sind eine Vielzahl verschiedener Antigen präsentierender Zellen anzutreffen. Neben den konventionellen Antigen präsentierenden Zellen wie den dendritischen Zellen sind weitere nicht konventionelle APCs wie die Kupferzellen, spezielle Endothelzellen (*Liver sinusoidal endothelial cells* - LSECs), Sternzellen und natürlich Hepatozyten anzutreffen (89). Aufgrund der steten Exposition zu Lipopolysacchariden innerhalb der Leber befinden sich beispielsweise die Kupferzellen in einem permanenten antiinflammatorischen Aktivierungsstatus, indem sie große Mengen an IL-10, TGF- $\beta$  und PGE2 sezernieren (104;105). Neben den Kupferzellen exprimieren und sezernieren auch die LSECs große Mengen an IL-10 wodurch sie ebenfalls zum antiinflammatorischen und immunsupprimierenden Milieu der Leber beitragen (105). Der größte Anteil an Zellen in der Leber wird von Hepatozyten ausgemacht, deren eigentliche Aufgabe in der Synthese und Sekretion von Proteinen und in der Entgiftung besteht. Nach erfolgter Gentherapie in Mäusen zeigten ebendiese Hepatozyten eine Hochregulation von FasL auf ihrer Oberfläche wodurch es

in Folge dessen zu einer FasL/Fas bedingten Eliminierung von T Effektor Zellen kommt (52). Mit diesen Toleranzinduzierenden Mechanismen war es sogar möglich, Hämophilie B Hunde mit bereits vorhandenen inhibitorischen Antikörpern gegen FIX mittels AAV Gentherapie zu behandeln. Bei diesen Tieren wurden nicht nur die inhibitorischen Antikörper aufgrund der Toleranzinduktion eliminiert sie erreichten sogar therapeutische und vor allem langanhaltende FIX Spiegel im Plasma (38). Neben den präklinischen Studien wurden diese Aspekte natürlich auch in den durchgeführten klinischen Studien an Hämophilie B Patienten verfolgt, allerdings konnten auch hier bislang weder thrombotische Effekte, noch Antikörper gegen FIX als Transgen selber verzeichnet werden (132;151;152).

Die in dieser Doktorarbeit erhobenen Daten konnten zeigen, dass die in diesem Labor generierten hyperaktiven FIX Varianten die Möglichkeit bieten die verwendete Vektordosis in der AAV Gentherapie für die Hämophilie B weiter zu reduzieren. Damit verbunden könnte eine Reduktion der Gentherapie bedingten immunologisch oder Stress induzierten Lebertoxizitäten sein. Im Hinblick auf die Sicherheit lieferten die in dieser Arbeit erhobenen Daten weder ein Indiz auf eine Erhöhung der Immunogenität durch die Mutationen, noch auf ein erhöhtes Thromboserisiko vermittelt durch die Hyperaktivität der FIX Varianten. Die KLV Variante, mit der verminderten Kollagen Typ IV Bindung, bietet das Potential für eine Weiterentwicklung in der Substitutionstherapie. Die pharmakokinetischen Daten aus dieser Doktorarbeit belegen sowohl nach intravenöser, als auch subkutaner Injektion eine drastisch gesteigerte Bioverfügbarkeit im Vergleich zum Wildtyp sowie der Padua und LW Variante. Der beobachteten schnelleren Eliminierung der KLV Proteine nach intravenöser Injektion könnte durch eine Kombination mit Halbwertszeit verlängerten Modifikationen entgegen gewirkt werden. Des Weiteren stellt diese Variante eine interessante Alternative zur Entwicklung einer subkutan zu applizierenden Substitutionstherapie dar und könnte darüber hinaus als Konkurrenz zum derzeit in der klinischen Studie getesteten Dalcinonacog alpha (NCT03995784) angesehen werden.

## 5 Literaturverzeichnis

- (1) Ahmad SS, Rawala-Sheikh R, Cheung WF, Jameson BA, Stafford DW, Walsh PN. High-affinity, specific factor IXa binding to platelets is mediated in part by residues 3-11. *Biochemistry* 1994;33:12048-55.
- (2) Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, Kay MA. The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol* 2006;80:9831-6.
- (3) Arruda VR, Schuettrumpf J, Herzog RW, Nichols TC, Robinson N, Lotfi Y, et al. Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood* 2004;103:85-92.
- (4) Asokan A, Hamra JB, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ. Adeno-associated virus type 2 contains an integrin  $\alpha 5 \beta 1$  binding domain essential for viral cell entry. *J Virol* 2006;80:8961-9.
- (5) Astermark J, Donfield SM, Gomperts ED, Schwarz J, Menius ED, Pavlova A, et al. The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood* 2013;121:1446-54.
- (6) ATCHISON RW, CASTO BC, HAMMON WM. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science* 1965;149:754-6.
- (7) Attard C, van der Straaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Developmental haemostasis: age-specific differences in the quantity of hemostatic proteins: reply to a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2014;12:286.
- (8) Barrowcliffe TW. Standardization of FVIII & FIX assays. *Haemophilia* 2003;9:397-402.

- (9) Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 2000;74:2777-85.
- (10) Batty P, Lillicrap D. Advances and challenges for hemophilia gene therapy. *Hum Mol Genet* 2019;28:R95-R101.
- (11) Bergmann WL, Dressler V, Haest CW, Deuticke B. Cross-linking of SH-groups in the erythrocyte membrane enhances transbilayer reorientation of phospholipids. Evidence for a limited access of phospholipids to the reorientation sites. *Biochim Biophys Acta* 1984;769:390-8.
- (12) Berns KI, Pinkerton TC, Thomas GF, Hoggan MD. Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 1975;68:556-60.
- (13) Bjorkman S, Carlsson M, Berntorp E. Pharmacokinetics of factor IX in patients with haemophilia B. Methodological aspects and physiological interpretation. *Eur J Clin Pharmacol* 1994;46:325-32.
- (14) Blasko E, Brooks AR, Ho E, Wu JM, Zhao XY, Subramanyam B. Hepatocyte clearance and pharmacokinetics of recombinant factor IX glycosylation variants. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;440:485-9.
- (15) Blostein MD, Furie BC, Rajotte I, Furie B. The Gla domain of factor IXa binds to factor VIIIa in the tenase complex. *J Biol Chem* 2003;278:31297-302.
- (16) Boisgerault F, Mingozi F. The Skeletal Muscle Environment and Its Role in Immunity and Tolerance to AAV Vector-Mediated Gene Transfer. *Curr Gene Ther* 2015;15:381-94.
- (17) Booth J, Oladapo A, Walsh S, O'Hara J, Carroll L, Garcia Diego DA, et al. Real-world comparative analysis of bleeding complications and health-related quality of life in patients with haemophilia A and haemophilia B. *Haemophilia* 2018;24:e322-e327.

- (18) Brandstetter H, Bauer M, Huber R, Lollar P, Bode W. X-ray structure of clotting factor IXa: active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9796-800.
- (19) Brooks AR, Sim D, Gritzan U, Patel C, Blasko E, Feldman RI, et al. Glycoengineered factor IX variants with improved pharmacokinetics and subcutaneous efficacy. *J Thromb Haemost* 2013;11:1699-706.
- (20) Buchlis G, Podsakoff GM, Radu A, Hawk SM, Flake AW, Mingozi F, et al. Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood* 2012;119:3038-41.
- (21) Buyue Y, Whinna HC, Sheehan JP. The heparin-binding exosite of factor IXa is a critical regulator of plasma thrombin generation and venous thrombosis. *Blood* 2008;112:3234-41.
- (22) Calcedo R, Morizono H, Wang L, McCarter R, He J, Jones D, et al. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18:1586-8.
- (23) Cantore A, Nair N, Della VP, Di MM, Matrai J, Sanvito F, et al. Hyperfunctional coagulation factor IX improves the efficacy of gene therapy in hemophilic mice. *Blood* 2012;120:4517-20.
- (24) Cao O, Hoffman BE, Moghimi B, Nayak S, Cooper M, Zhou S, et al. Impact of the underlying mutation and the route of vector administration on immune responses to factor IX in gene therapy for hemophilia B. *Mol Ther* 2009;17:1733-42.
- (25) Castoldi E, Hackeng TM. Regulation of coagulation by protein S. *Curr Opin Hematol* 2008;15:529-36.
- (26) Castro AP, Aguas AP, Silva MT. Adjuvant treatment increases the resistance to *Mycobacterium avium* infection of mycobacteria-susceptible BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 1993;92:466-72.



- (27) Chandler RJ, LaFave MC, Varshney GK, Trivedi NS, Carrillo-Carrasco N, Senac JS, et al. Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest* 2015;125:870-80.
- (28) Chang J, Jin J, Lollar P, Bode W, Brandstetter H, Hamaguchi N, et al. Changing residue 338 in human factor IX from arginine to alanine causes an increase in catalytic activity. *J Biol Chem* 1998;273:12089-94.
- (29) Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, Roopenian DC, et al. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med* 2003;197:315-22.
- (30) Cheung WF, Hamaguchi N, Smith KJ, Stafford DW. The binding of human factor IX to endothelial cells is mediated by residues 3-11. *J Biol Chem* 1992;267:20529-31.
- (31) Cheung WF, van den Born J, Kuhn K, Kjellen L, Hudson BG, Stafford DW. Identification of the endothelial cell binding site for factor IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11068-73.
- (32) Ciuffi A. Mechanisms governing lentivirus integration site selection. *Curr Gene Ther* 2008;8:419-29.
- (33) Collins PW, Palmer BP, Chalmers EA, Hart DP, Liesner R, Rangarajan S, et al. Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe hemophilia A, 2000-2011. *Blood* 2014;124:3389-97.
- (34) Collins PW, Young G, Knobe K, Karim FA, Angchaisuksiri P, Banner C, et al. Recombinant long-acting glycoPEGylated factor IX in hemophilia B: a multinational randomized phase 3 trial. *Blood* 2014;124:3880-6.
- (35) Colman RW. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? *J Exp Med* 2006;203:493-5.

- (36) Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11023-7.
- (37) Coughlin SR. Protease-activated receptors and platelet function. *Thromb Haemost* 1999;82:353-6.
- (38) Crudele JM, Finn JD, Siner JI, Martin NB, Niemeyer GP, Zhou S, et al. AAV liver expression of FIX-Padua prevents and eradicates FIX inhibitor without increasing thrombogenicity in hemophilia B dogs and mice. *Blood* 2015;125:1553-61.
- (39) Czapinska H, Otlewski J. Structural and energetic determinants of the S1-site specificity in serine proteases. *Eur J Biochem* 1999;260:571-95.
- (40) D'Avola D, Lopez-Franco E, Sangro B, Paneda A, Grossios N, Gil-Farina I, et al. Phase I open label liver-directed gene therapy clinical trial for acute intermittent porphyria. *J Hepatol* 2016;65:776-83.
- (41) Darby SC, Keeling DM, Spooner RJ, Wan KS, Giangrande PL, Collins PW, et al. The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99. *J Thromb Haemost* 2004;2:1047-54.
- (42) Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:583-93.
- (43) Derian CK, VanDusen W, Przysiecki CT, Walsh PN, Berkner KL, Kaufman RJ, et al. Inhibitors of 2-ketoglutarate-dependent dioxygenases block aspartyl beta-hydroxylation of recombinant human factor IX in several mammalian expression systems. *J Biol Chem* 1989;264:6615-8.
- (44) Di Minno MN, Ambrosino P, Franchini M, Coppola A, Di MG. Arthropathy in patients with moderate hemophilia a: a systematic review of the literature. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:723-31.

- (45) Di GP, Minnucci FS, Alves Rosa MF, Vulcano M, Isturiz MA. Anti-oxidants inhibit the enhancement of the immune response caused by oil adjuvants. *Scand J Immunol* 1996;43:413-20.
- (46) Dick LR, Cruikshank AA, Destree AT, Grenier L, McCormack TA, Melandri FD, et al. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin in cultured cells. *J Biol Chem* 1997;272:182-8.
- (47) Ding W, Zhang L, Yan Z, Engelhardt JF. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 2005;12:873-80.
- (48) Ding W, Zhang LN, Yeaman C, Engelhardt JF. rAAV2 traffics through both the late and the recycling endosomes in a dose-dependent fashion. *Mol Ther* 2006;13:671-82.
- (49) Donsante A, Miller DG, Li Y, Vogler C, Brunt EM, Russell DW, et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 2007;317:477.
- (50) Duan D, Li Q, Kao AW, Yue Y, Pessin JE, Engelhardt JF. Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 1999;73:10371-6.
- (51) Ertl HCJ, High KA. Impact of AAV Capsid-Specific T-Cell Responses on Design and Outcome of Clinical Gene Transfer Trials with Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors: An Evolving Controversy. *Hum Gene Ther* 2017;28:328-37.
- (52) Faust SM, Bell P, Zhu Y, Sanmiguel J, Wilson JM. The role of apoptosis in immune hyporesponsiveness following AAV8 liver gene transfer. *Mol Ther* 2013;21:2227-35.
- (53) Finn JD, Hui D, Downey HD, Dunn D, Pien GC, Mingozi F, et al. Proteasome inhibitors decrease AAV2 capsid derived peptide epitope presentation on MHC class I following transduction. *Mol Ther* 2010;18:135-42.

- (54) Finn JD, Nichols TC, Svoronos N, Merricks EP, Bellenger DA, Zhou S, et al. The efficacy and the risk of immunogenicity of FIX Padua (R338L) in hemophilia B dogs treated by AAV muscle gene therapy. *Blood* 2012;120:4521-3.
- (55) Fischer K, Collins P, Bjorkman S, Blanchette V, Oh M, Fritsch S, et al. Trends in bleeding patterns during prophylaxis for severe haemophilia: observations from a series of prospective clinical trials. *Haemophilia* 2011;17:433-8.
- (56) Fischer K, Lassila R, Peyvandi F, Calizzani G, Gatt A, Lambert T, et al. Inhibitor development in haemophilia according to concentrate. Four-year results from the European HAemophilia Safety Surveillance (EUHASS) project. *Thromb Haemost* 2015;113:968-75.
- (57) Fischer K, Ljung R. Primary prophylaxis in haemophilia care: Guideline update 2016. *Blood Cells Mol Dis* 2017;67:81-5.
- (58) Fischer K, van der Bom JG, Mauser-Bunschoten EP, Roosendaal G, Prejs R, Grobbee DE, et al. Changes in treatment strategies for severe haemophilia over the last 3 decades: effects on clotting factor consumption and arthropathy. *Haemophilia* 2001;7:446-52.
- (59) Flotte TR, Mueller C. What is suppression of anti-adenovirus capsid T-cells achieving? *Hum Gene Ther* 2014;25:178-9.
- (60) Francois A, Bouzelha M, Lecomte E, Broucque F, Penaud-Budloo M, Adjali O, et al. Accurate Titration of Infectious AAV Particles Requires Measurement of Biologically Active Vector Genomes and Suitable Controls. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2018;10:223-36.
- (61) Fuchs HE, Trapp HG, Griffith MJ, Roberts HR, Pizzo SV. Regulation of factor IXa in vitro in human and mouse plasma and in vivo in the mouse. Role of the endothelium and the plasma proteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1984;73:1696-703.
- (62) Fukuda M, Mikoshiba K. Synaptotagmin-like protein 1-3: a novel family of C-terminal-type tandem C2 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:1226-33.

- (63) Gailani D, Renne T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J Thromb Haemost* 2007;5:1106-12.
- (64) Gailani D, Smith SB. Structural and functional features of factor XI. *J Thromb Haemost* 2009;7 Suppl 1:75-8.
- (65) Gale AJ. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol* 2011;39:273-80.
- (66) Gao G, Alvira MR, Somanathan S, Lu Y, Vandenberghe LH, Rux JJ, et al. Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6081-6.
- (67) Ge Y, Powell S, Van RM, McArthur JG. Factors influencing the development of an anti-factor IX (FIX) immune response following administration of adeno-associated virus-FIX. *Blood* 2001;97:3733-7.
- (68) George LA, Fogarty PF. Gene therapy for hemophilia: past, present and future. *Semin Hematol* 2016;53:46-54.
- (69) George LA, Sullivan SK, Giermasz A, Rasko JEJ, Samelson-Jones BJ, Ducore J, et al. Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. *N Engl J Med* 2017;377:2215-27.
- (70) George LA, Sullivan SK, Giermasz A, Rasko JEJ, Samelson-Jones BJ, Ducore J, et al. Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. *N Engl J Med* 2017;377:2215-27.
- (71) Gouw SC, Fijnvandraat K. Unraveling the genetics of inhibitors in hemophilia. *Blood* 2013;121:1250-1.
- (72) Gouw SC, van den Berg HM. The multifactorial etiology of inhibitor development in hemophilia: genetics and environment. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:723-34.

- (73) Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, Astermark J, de Groot PG, Margaglione M, et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood* 2012;119:2922-34.
- (74) Grieger JC, Snowdy S, Samulski RJ. Separate basic region motifs within the adeno-associated virus capsid proteins are essential for infectivity and assembly. *J Virol* 2006;80:5199-210.
- (75) Grosse S, Penaud-Budloo M, Herrmann AK, Borner K, Fakhiri J, Laketa V, et al. Relevance of Assembly-Activating Protein for Adeno-associated Virus Vector Production and Capsid Protein Stability in Mammalian and Insect Cells. *J Virol* 2017;91.
- (76) Gui T, Lin HF, Jin DY, Hoffman M, Straight DL, Roberts HR, et al. Circulating and binding characteristics of wild-type factor IX and certain Gla domain mutants in vivo. *Blood* 2002;100:153-8.
- (77) Gui T, Reheman A, Ni H, Gross PL, Yin F, Monroe D, et al. Abnormal hemostasis in a knock-in mouse carrying a variant of factor IX with impaired binding to collagen type IV. *J Thromb Haemost* 2009;7:1843-51.
- (78) Hansson K, Stenflo J. Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. *J Thromb Haemost* 2005;3:2633-48.
- (79) Haya S. Prophylactic treatment in hemophilic patients with inhibitors. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2019;30:S14-S18.
- (80) Heeger PS, Forsthuber T, Shive C, Biekert E, Genain C, Hofstetter HH, et al. Revisiting tolerance induced by autoantigen in incomplete Freund's adjuvant. *J Immunol* 2000;164:5771-81.
- (81) Heimark RL, Schwartz SM. Binding of coagulation factors IX and X to the endothelial cell surface. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;111:723-31.

- (82) Helms JB, Rothman JE. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* 1992;360:352-4.
- (83) Herzog RW. Immune responses to AAV capsid: are mice not humans after all? *Mol Ther* 2007;15:649-50.
- (84) Herzog RW. Complexity of immune responses to AAV transgene products - Example of factor IX. *Cell Immunol* 2019;342:103658.
- (85) HJORT PF, EGEBERG O, MIKKELSEN S. Turnover of prothrombin, factor VII and factor IX in a patient with hemophilia A. *Scand J Clin Lab Invest* 1961;13:668-72.
- (86) Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 2003;16:17-20.
- (87) Hopfner KP, Brandstetter H, Karcher A, Kopetzki E, Huber R, Engh RA, et al. Converting blood coagulation factor IXa into factor Xa: dramatic increase in amidolytic activity identifies important active site determinants. *EMBO J* 1997;16:6626-35.
- (88) Hopfner KP, Lang A, Karcher A, Sichler K, Kopetzki E, Brandstetter H, et al. Coagulation factor IXa: the relaxed conformation of Tyr99 blocks substrate binding. *Structure* 1999;7:989-96.
- (89) Horst AK, Neumann K, Diehl L, Tiegs G. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cell Mol Immunol* 2016;13:277-92.
- (90) Hudson BG. The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2514-27.
- (91) Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 2003;348:2543-56.

- (92) Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, et al. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8695-9.
- (93) Jensen FC, Savary JR, Diveley JP, Chang JC. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;32:173-86.
- (94) Jiang H, Pierce GF, Ozelo MC, de Paula EV, Vargas JA, Smith P, et al. Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther* 2006;14:452-5.
- (95) Johansson L, Karpf DM, Hansen L, Pelzer H, Persson E. Activation peptides prolong the murine plasma half-life of human factor VII. *Blood* 2011;117:3445-52.
- (96) Johnson FB, Ozer HL, Hoggan MD. Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3. *J Virol* 1971;8:860-3.
- (97) Johnson JS, Samulski RJ. Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. *J Virol* 2009;83:2632-44.
- (98) Kao CY, Yang SJ, Tao MH, Jeng YM, Yu IS, Lin SW. Incorporation of the factor IX Padua mutation into FIX-Triple improves clotting activity in vitro and in vivo. *Thromb Haemost* 2013;110:244-56.
- (99) Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, Hirai Y, Shimada T, Matsumoto K, et al. Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 2005;79:609-14.
- (100) Kattenhorn LM, Tipper CH, Stoica L, Geraghty DS, Wright TL, Clark KR, et al. Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Hum Gene Ther* 2016;27:947-61.
- (101) Kershaw G, Jayakodi D, Dunkley S. Laboratory identification of factor inhibitors: the perspective of a large tertiary hemophilia center. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:760-8.



- (102) Key NS. Inhibitors in congenital coagulation disorders. *Br J Haematol* 2004;127:379-91.
- (103) Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G, Offermanns S. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol* 1999;144:745-54.
- (104) Knolle P, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 1995;22:226-9.
- (105) Knolle PA, Uhrig A, Protzer U, Trippler M, Duchmann R, Meyer zum Buschenfelde KH, et al. Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells. *Hepatology* 1998;27:93-9.
- (106) Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-60.
- (107) Kruzik A, Fetahagic D, Hartlieb B, Dorn S, Koppensteiner H, Horling FM, et al. Prevalence of Anti-Adeno-Associated Virus Immune Responses in International Cohorts of Healthy Donors. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2019;14:126-33.
- (108) Kurachi S, Pantazatos DP, Kurachi K. The carboxyl-terminal region of factor IX is essential for its secretion. *Biochemistry* 1997;36:4337-44.
- (109) Kurnik K, Auerswald G, Kreuz W. Inhibitors and prophylaxis in paediatric haemophilia patients: focus on the German experience. *Thromb Res* 2014;134 Suppl 1:S27-S32.
- (110) Le QS, Dane A, Enjolras N, McIntosh J, Rosales C, Negrier C, et al. Potential limits of AAV-based gene therapy with the use of new transgenes expressing factor IX fusion proteins. *Haemophilia* 2019;25:e11-e18.

- (111) Le QS, Dane AP, Barbon E, Bordet JC, Mingozi F, Dargaud Y, et al. Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors Expressing Human Coagulation FIX-E456H Variant in Hemophilia B Mice. *Thromb Haemost* 2019;119:1956-67.
- (112) Li H, Malani N, Hamilton SR, Schlachterman A, Bussadori G, Edmonson SE, et al. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* 2011;117:3311-9.
- (113) Lillicrap D, Fijnvandraat K, Young G, Mancuso ME. Patients with hemophilia A and inhibitors: prevention and evolving treatment paradigms. *Expert Rev Hematol* 2020;13:313-21.
- (114) Lin CN, Kao CY, Miao CH, Hamaguchi N, Wu HL, Shi GY, et al. Generation of a novel factor IX with augmented clotting activities in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost* 2010;8:1773-83.
- (115) Ling C, Lu Y, Kalsi JK, Jayandharan GR, Li B, Ma W, et al. Human hepatocyte growth factor receptor is a cellular coreceptor for adeno-associated virus serotype 3. *Hum Gene Ther* 2010;21:1741-7.
- (116) Liu J, Jonebring A, Hagstrom J, Nystrom AC, Lovgren A. Improved expression of recombinant human factor IX by co-expression of GGCX, VKOR and furin. *Protein J* 2014;33:174-83.
- (117) Ljung R. Aspects of prophylactic treatment of hemophilia. *Thromb J* 2016;14:30.
- (118) Ljung R, Auerswald G, Benson G, Dolan G, Duffy A, Hermans C, et al. Inhibitors in haemophilia A and B: Management of bleeds, inhibitor eradication and strategies for difficult-to-treat patients. *Eur J Haematol* 2019;102:111-22.
- (119) Ljung R, Petrini P, Tengborn L, Sjorin E. Haemophilia B mutations in Sweden: a population-based study of mutational heterogeneity. *Br J Haematol* 2001;113:81-6.

- (120) Lotery AJ, Yang GS, Mullins RF, Russell SR, Schmidt M, Stone EM, et al. Adeno-associated virus type 5: transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina. *Hum Gene Ther* 2003;14:1663-71.
- (121) Lux K, Goerlitz N, Schlemminger S, Perabo L, Goldnau D, Endell J, et al. Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. *J Virol* 2005;79:11776-87.
- (122) Majowicz A, Nijmeijer B, Lampen MH, Spronck L, de HM, Petry H, et al. Therapeutic hFIX Activity Achieved after Single AAV5-hFIX Treatment in Hemophilia B Patients and NHPs with Pre-existing Anti-AAV5 NABs. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2019;14:27-36.
- (123) Makino Y, Omichi K, Kuraya N, Ogawa H, Nishimura H, Iwanaga S, et al. Structural analysis of N-linked sugar chains of human blood clotting factor IX. *J Biochem* 2000;128:175-80.
- (124) Mancuso ME, Berardinelli L, Beretta C, Raiteri M, Pozzoli E, Santagostino E. Improved treatment feasibility in children with hemophilia using arteriovenous fistulae: the results after seven years of follow-up. *Haematologica* 2009;94:687-92.
- (125) Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost* 2003;1:1504-14.
- (126) Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 2003;101:2963-72.
- (127) Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006;12:342-7.
- (128) Mannucci PM. AIDS, hepatitis and hemophilia in the 1980s: memoirs from an insider. *J Thromb Haemost* 2003;1:2065-9.

- (129) Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med* 2001;344:1773-9.
- (130) Melchiorre D, Manetti M, Matucci-Cerinic M. Pathophysiology of Hemophilic Arthropathy. *J Clin Med* 2017;6.
- (131) Mercer J, Helenius A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* 2009;11:510-20.
- (132) Miesbach W, Meijer K, Coppens M, Kampmann P, Klamroth R, Schutgens R, et al. Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with hemophilia B. *Blood* 2018;131:1022-31.
- (133) Milanov P, Ivanciu L, Abriss D, Quade-Lyssy P, Miesbach W, Alesci S, et al. Engineered factor IX variants bypass FVIII and correct hemophilia A phenotype in mice. *Blood* 2012;119:602-11.
- (134) Miller CH, Benson J, Ellingsen D, Driggers J, Payne A, Kelly FM, et al. F8 and F9 mutations in US haemophilia patients: correlation with history of inhibitor and race/ethnicity. *Haemophilia* 2012;18:375-82.
- (135) Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther* 2011;11:321-30.
- (136) Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 2011;12:341-55.
- (137) Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 2013;122:23-36.
- (138) Mingozzi F, Maus MV, Hui DJ, Sabatino DE, Murphy SL, Rasko JE, et al. CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* 2007;13:419-22.
- (139) Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 2007;13:108-16.

- (140) Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol* 2011;89:346-51.
- (141) Monahan PE, Sun J, Gui T, Hu G, Hannah WB, Wichlan DG, et al. Employing a gain-of-function factor IX variant R338L to advance the efficacy and safety of hemophilia B human gene therapy: preclinical evaluation supporting an ongoing adeno-associated virus clinical trial. *Hum Gene Ther* 2015;26:69-81.
- (142) Morado M, Villar A, Jimenez Y, V, Quintana M, Hernandez NF. Prophylactic treatment effects on inhibitor risk: experience in one centre. *Haemophilia* 2005;11:79-83.
- (143) Morrissey JH. Plasma factor VIIa: measurement and potential clinical significance. *Haemostasis* 1996;26 Suppl 1:66-71.
- (144) Morrissey JH. Tissue factor: a key molecule in hemostatic and nonhemostatic systems. *Int J Hematol* 2004;79:103-8.
- (145) Morrissey JH, Neuenschwander PF, Huang Q, McCallum CD, Su B, Johnson AE. Factor VIIa-tissue factor: functional importance of protein-membrane interactions. *Thromb Haemost* 1997;78:112-6.
- (146) Mussener A, Klareskog L, Lorentzen JC, Kleinau S. TNF-alpha dominates cytokine mRNA expression in lymphoid tissues of rats developing collagen- and oil-induced arthritis. *Scand J Immunol* 1995;42:128-34.
- (147) Nair N, Rincon MY, Evens H, Sarcar S, Dastidar S, Samara-Kuko E, et al. Computationally designed liver-specific transcriptional modules and hyperactive factor IX improve hepatic gene therapy. *Blood* 2014;123:3195-9.
- (148) Nakai H, Iwaki Y, Kay MA, Couto LB. Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. *J Virol* 1999;73:5438-47.

- (149) Nathwani AC. Gene therapy for hemophilia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2019;2019:1-8.
- (150) Nathwani AC, Gray JT, Ng CY, Zhou J, Spence Y, Waddington SN, et al. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 2006;107:2653-61.
- (151) Nathwani AC, Nienhuis AW, Davidoff AM. Our journey to successful gene therapy for hemophilia B. *Hum Gene Ther* 2014;25:923-6.
- (152) Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* 2014;371:1994-2004.
- (153) Nathwani AC, Rosales C, McIntosh J, Rastegarlar G, Nathwani D, Raj D, et al. Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol Ther* 2011;19:876-85.
- (154) Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 2011;365:2357-65.
- (155) Neels JG, van Den Berg BM, Mertens K, ter MH, Pannekoek H, van Zonneveld AJ, et al. Activation of factor IX zymogen results in exposure of a binding site for low-density lipoprotein receptor-related protein. *Blood* 2000;96:3459-65.
- (156) Niemetz J, Nossel HL. Activated coagulation factors: in-vivo and in-vitro studies. *Br J Haematol* 1969;16:337-51.
- (157) Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* 1997;389:183-6.

- (158) Okajima K, Koga S, Kaji M, Inoue M, Nakagaki T, Funatsu A, et al. Effect of protein C and activated protein C on coagulation and fibrinolysis in normal human subjects. *Thromb Haemost* 1990;63:48-53.
- (159) Ostergaard H, Bjelke JR, Hansen L, Petersen LC, Pedersen AA, Elm T, et al. Prolonged half-life and preserved enzymatic properties of factor IX selectively PEGylated on native N-glycans in the activation peptide. *Blood* 2011;118:2333-41.
- (160) Otaki JM, Ienaka S, Gotoh T, Yamamoto H. Availability of short amino acid sequences in proteins. *Protein Sci* 2005;14:617-25.
- (161) Paroskie A, Gailani D, Debaun MR, Sidonio RF, Jr. A cross-sectional study of bleeding phenotype in haemophilia A carriers. *Br J Haematol* 2015;170:223-8.
- (162) Perot E, Enjolras N, Le QS, Indalecio A, Girard J, Negrier C, et al. Expression and characterization of a novel human recombinant factor IX molecule with enhanced in vitro and in vivo clotting activity. *Thromb Res* 2015;135:1017-24.
- (163) Peters R, Harris T. Advances and innovations in haemophilia treatment. *Nat Rev Drug Discov* 2018;17:493-508.
- (164) Pien GC, Basner-Tschakarjan E, Hui DJ, Mentlik AN, Finn JD, Hasbrouck NC, et al. Capsid antigen presentation flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors. *J Clin Invest* 2009;119:1688-95.
- (165) Pipe SW. New therapies for hemophilia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016;2016:650-6.
- (166) Pool JG, Shannon AE. Production of high-potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed-bag system. *N Engl J Med* 1965;273:1443-7.
- (167) Powell JS, Pasi KJ, Ragni MV, Ozelo MC, Valentino LA, Mahlangu JN, et al. Phase 3 study of recombinant factor IX Fc fusion protein in hemophilia B. *N Engl J Med* 2013;369:2313-23.

- (168) Presnell SR, Stafford DW. The vitamin K-dependent carboxylase. *Thromb Haemost* 2002;87:937-46.
- (169) Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 1999;5:71-7.
- (170) Quade-Lyssy P, Abriss D, Milanov P, Ungerer C, Konigs C, Seifried E, et al. Next generation FIX muteins with FVIII-independent activity for alternative treatment of hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2014;12:1861-73.
- (171) Quade-Lyssy P, Milanov P, Abriss D, Ungerer C, Konigs C, Seifried E, et al. Oral gene therapy for hemophilia B using chitosan-formulated FIX mutants. *J Thromb Haemost* 2014;12:932-42.
- (172) Rangarajan S, Walsh L, Lester W, Perry D, Madan B, Laffan M, et al. AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *N Engl J Med* 2017;377:2519-30.
- (173) Rees DJ, Jones IM, Handford PA, Walter SJ, Esnouf MP, Smith KJ, et al. The role of beta-hydroxyaspartate and adjacent carboxylate residues in the first EGF domain of human factor IX. *EMBO J* 1988;7:2053-61.
- (174) Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a004978.
- (175) Ricard-Blum S, Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)* 2005;53:430-42.
- (176) Roberts HR, LECHLER E, Webster WP, Penick GD. SURVIVAL OF TRANSFUSED FACTOR X IN PATIENTS WITH STUART DISEASE. *Thromb Diath Haemorrh* 1965;13:305-13.
- (177) Roosendaal G, Lefeber FP. Pathogenesis of haemophilic arthropathy. *Haemophilia* 2006;12 Suppl 3:117-21.



- (178) Rose JA, Maizel JV, Jr., Inman JK, Shatkin AJ. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J Virol* 1971;8:766-70.
- (179) Rowley G, Saad S, Giannelli F, Green PM. Ultrarapid mutation detection by multiplex, solid-phase chemical cleavage. *Genomics* 1995;30:574-82.
- (180) Saini S, Hamasaki-Katagiri N, Pandey GS, Yanover C, Guelcher C, Simhadri VL, et al. Genetic determinants of immunogenicity to factor IX during the treatment of haemophilia B. *Haemophilia* 2015;21:210-8.
- (181) Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009;21:1105-11.
- (182) Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775-87.
- (183) Samelson-Jones BJ, Arruda VR. Protein-Engineered Coagulation Factors for Hemophilia Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2019;12:184-201.
- (184) Samelson-Jones BJ, Finn JD, George LA, Camire RM, Arruda VR. Hyperactivity of factor IX Padua (R338L) depends on factor VIIIa cofactor activity. *JCI Insight* 2019;5.
- (185) Samelson-Jones BJ, Finn JD, George LA, Camire RM, Arruda VR. Hyperactivity of factor IX Padua (R338L) depends on factor VIIIa cofactor activity. *JCI Insight* 2019;5.
- (186) Santagostino E. Transforming the treatment for hemophilia B patients: update on the clinical development of recombinant fusion protein linking recombinant coagulation factor IX with recombinant albumin (rIX-FP). *Thromb Res* 2016;141 Suppl 3:S5-S8.
- (187) Santagostino E, Martinowitz U, Lissitchkov T, Pan-Peteshtch B, Hanabusa H, Oldenburg J, et al. Long-acting recombinant coagulation factor IX albumin fusion protein (rIX-FP) in hemophilia B: results of a phase 3 trial. *Blood* 2016;127:1761-9.

- (188) Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 1967;27:157-62.
- (189) Schmidt AE, Bajaj SP. Structure-function relationships in factor IX and factor IXa. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:39-45.
- (190) Schmidt M, Govindasamy L, Afione S, Kaludov N, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA. Molecular characterization of the heparin-dependent transduction domain on the capsid of a novel adeno-associated virus isolate, AAV(VR-942). *J Virol* 2008;82:8911-6.
- (191) Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, Zheng C, Mandikian D, Chiorini JA. Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J Virol* 2008;82:1399-406.
- (192) Schulte S. Innovative coagulation factors: albumin fusion technology and recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res* 2013;131 Suppl 2:S2-S6.
- (193) Seiler MP, Miller AD, Zabner J, Halbert CL. Adeno-associated virus types 5 and 6 use distinct receptors for cell entry. *Hum Gene Ther* 2006;17:10-9.
- (194) Shen S, Berry GE, Castellanos Rivera RM, Cheung RY, Troupes AN, Brown SM, et al. Functional analysis of the putative integrin recognition motif on adeno-associated virus 9. *J Biol Chem* 2015;290:1496-504.
- (195) Sichler K, Kopetzki E, Huber R, Bode W, Hopfner KP, Brandstetter H. Physiological fIXa activation involves a cooperative conformational rearrangement of the 99-loop. *J Biol Chem* 2003;278:4121-6.
- (196) Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP, et al. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med* 2009;361:1671-5.

- (197) Soriano-Garcia M, Padmanabhan K, de Vos AM, Tulinsky A. The Ca<sup>2+</sup> ion and membrane binding structure of the Gla domain of Ca-prothrombin fragment 1. *Biochemistry* 1992;31:2554-66.
- (198) Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol* 2016;21:75-80.
- (199) Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia* 2013;19:e1-47.
- (200) Stephensen D, Tait RC, Brodie N, Collins P, Cheal R, Keeling D, et al. Changing patterns of bleeding in patients with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2009;15:1210-4.
- (201) Stern DM, Knitter G, Kisiel W, Nawroth PP. In vivo evidence of intravascular binding sites for coagulation factor IX. *Br J Haematol* 1987;66:227-32.
- (202) Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 1999;5:78-82.
- (203) Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 1998;72:1438-45.
- (204) Terraube V, O'Donnell JS, Jenkins PV. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia* 2010;16:3-13.
- (205) van den Berg HM, De Groot PH, Fischer K. Phenotypic heterogeneity in severe hemophilia. *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1:151-6.
- (206) van KR, Mattheij NJ, Saunders C, Feijge MA, Swieringa F, Wolfs JL, et al. Both TMEM16F-dependent and TMEM16F-independent pathways contribute to phosphatidylserine exposure in platelet apoptosis and platelet activation. *Blood* 2013;121:1850-7.

- (207) Viel KR, Ameri A, Abshire TC, Iyer RV, Watts RG, Lutcher C, et al. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N Engl J Med* 2009;360:1618-27.
- (208) Vogt L, Schimpf SP, Meskenaite V, Frischknecht R, Kinter J, Leone DP, et al. Calsyntenin-1, a proteolytically processed postsynaptic membrane protein with a cytoplasmic calcium-binding domain. *Mol Cell Neurosci* 2001;17:151-66.
- (209) Vysotchin A, Medved LV, Ingham KC. Domain structure and domain-domain interactions in human coagulation factor IX. *J Biol Chem* 1993;268:8436-46.
- (210) Walters RW, Pilewski JM, Chiorini JA, Zabner J. Secreted and transmembrane mucins inhibit gene transfer with AAV4 more efficiently than AAV5. *J Biol Chem* 2002;277:23709-13.
- (211) Walters RW, Yi SM, Keshavjee S, Brown KE, Welsh MJ, Chiorini JA, et al. Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem* 2001;276:20610-6.
- (212) Webster WP, Roberts HR, Thelin GM, Wagner RH, Brinkhous KM. Clinical use of a new glycine-precipitated antihemophilic fraction. *Am J Med Sci* 1965;250:643-51.
- (213) Weller ML, Amornphimoltham P, Schmidt M, Wilson PA, Gutkind JS, Chiorini JA. Epidermal growth factor receptor is a co-receptor for adeno-associated virus serotype 6. *Nat Med* 2010;16:662-4.
- (214) White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85:560.
- (215) Williams SC, Gray E. Activity measurements of dalcinonacog alfa. *Haemophilia* 2020;26:346-53.
- (216) Wilmot HV, Hogwood J, Gray E. Recombinant factor IX: discrepancies between one-stage clotting and chromogenic assays. *Haemophilia* 2014;20:891-7.

- (217) Wolberg AS, Li L, Cheung WF, Hamaguchi N, Pedersen LG, Stafford DW. Characterization of gamma-carboxyglutamic acid residue 21 of human factor IX. *Biochemistry* 1996;35:10321-7.
- (218) Wu Z, Miller E, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ. Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *J Virol* 2006;80:9093-103.
- (219) Xiao W, Warrington KH, Jr., Hearing P, Hughes J, Muzyczka N. Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2. *J Virol* 2002;76:11505-17.
- (220) Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol* 2011;23:424-30.
- (221) Yang L, Manithody C, Rezaie AR. Localization of the heparin binding exosite of factor IXa. *J Biol Chem* 2002;277:50756-60.
- (222) Yip HC, Karulin AY, Tary-Lehmann M, Hesse MD, Radeke H, Heeger PS, et al. Adjuvant-guided type-1 and type-2 immunity: infectious/noninfectious dichotomy defines the class of response. *J Immunol* 1999;162:3942-9.
- (223) Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* 1985;24:3736-50.
- (224) Zhu J, Huang X, Yang Y. The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J Clin Invest* 2009;119:2388-98.
- (225) Zogg T, Brandstetter H. Activation mechanisms of coagulation factor IX. *Biol Chem* 2009;390:391-400.

- (226) Zogg T, Brandstetter H. Structural basis of the cofactor- and substrate-assisted activation of human coagulation factor IXa. *Structure* 2009;17:1669-78.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungen

<b>AAV</b>	Adeno-assoziierte Viren
<b>APCs</b>	Antigenpräsentierende Zellen
<b>aPTT</b>	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>CHO</b>	Chinese Hamster Ovary
<b>co</b>	Kodon optimiert
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CRM</b>	<i>Cross reacting material</i> -Kreuzreagierendes Material
<b>C-Terminal</b>	Carboxy-Terminal
<b>DAPI</b>	4',6 Diamidin-2-phenylindol
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Destilliertes Wasser
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTPs</b>	Nukleosidtriphosphate
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E.coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
<b>EHL</b>	<i>Enhanced Half Life</i> – verlängerte Halbwertszeit
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>EPOR</b>	Erythropoietin Rezeptor
<b>et al.</b>	Und andere
<b>Fc</b>	<i>Fragment crystallizable</i>
<b>FDA</b>	Arzneimittelbehörde
<b>FGFR1</b>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
<b>FIX</b>	Gerinnungsfaktor IX
<b>FV</b>	Gerinnungsfaktor V

<b>FVII</b>	Gerinnungsfaktor VII
<b>FVIII</b>	Gerinnungsfaktor VIII
<b>fwd</b>	Forward - vorwärts
<b>FX</b>	Gerinnungsfaktor X
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>h</b>	Stunden ( <i>hour</i> )
<b>HEK</b>	<i>Human Embryonic Kidney</i>
<b>HF</b>	<i>High Fidelity</i>
<b>HGFR</b>	<i>Hepatocyte Growth Factor receptor</i>
<b>HRP</b>	Meerrettich Peroxidase ( <i>Horse raddish peroxidase</i> )
<b>HUVEC</b>	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IL-10</b>	Interleukin-10
<b>ITR</b>	<i>Inverted Terminal Repeats</i>
<b>IU</b>	<i>Injection Units</i> - Injektionseinheiten
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>KLW</b>	V10 <u>K</u> + R338 <u>L</u> + S377 <u>W</u>
<b>l</b>	Liter
<b>LP1 Promoter</b>	<i>Non-specific lipid-transfer protein 1 Promoter</i>
<b>LSECs</b>	<i>Liver Sinusoidal Endothelial Cells</i>
<b>LV</b>	Lentivirale Vektoren
<b>LW</b>	R338 <u>L</u> + S377 <u>W</u>
<b>M</b>	Molar (mol/l)
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MHCI/II</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex I/II
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mM</b>	Millimolar (mM/l)
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>MW</b>	Mittelwert



<b>n</b>	Mengenangabe
<b>naPTT</b>	Nicht aktivierte partielle Thromboplastinzeit
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>nm</b>	Nanometer
<b>N-Terminal</b>	Amino-Terminal
<b>OPD</b>	o-Phenylendiamin
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i> – offener Leserahmen
<b>Padua</b>	R338L
<b>PARs</b>	Protease-aktivierte Rezeptoren
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
<b>PBMCs</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion
<b>PDGFR</b>	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
<b>qPCR</b>	<i>Real Time Quantitative PCR</i> – quantitative Echtzeit PCR
<b>rev</b>	<i>Reverse</i> - rückwärts
<b>rpm</b>	<i>Rounds per minute</i> – relative Zentrifugalbeschleunigung
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>sc</b>	selbstkomplementär
<b>SDS</b>	Natriumlaurylsulfat ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<b>SEM</b>	Standardfehler des Mittelwerts
<b>TBS</b>	Trisgepufferte Salzlösung (Tris Buffered Saline)
<b>TF</b>	<i>Tissue Factor</i> - Gewebefaktor
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	<i>Transforming Growth Factor <math>\alpha</math></i>
<b>Tregs</b>	Regulatorische T Zellen
<b>U</b>	<i>Unit</i> - Einheiten
<b>vg</b>	Vektorgenome
<b>vg/kg</b>	Vektorgenome pro Kilogramm Körpergewicht
<b>VSV-G</b>	Vesicular Stomatitis Virus G
<b>vWF</b>	von Willebrand Faktor
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation
<b>WT</b>	Wildtyp

<b>Alanin</b>	<b>Ala</b>	<b>A</b>
<b>Arginin</b>	Arg	R
<b>Asparagin</b>	Asn	N
<b>Asparaginsäure</b>	Asp	D
<b>Cystein</b>	Cys	C
<b>Glutamin</b>	Gln	Q
<b>Glutaminsäure</b>	Glu	E
<b>Glycin</b>	Gly	G
<b>Histidin</b>	His	H
<b>Isoleucin</b>	Ile	I
<b>Leucin</b>	Leu	L
<b>Lysin</b>	Lys	K
<b>Methionin</b>	Met	M
<b>Phenylalanin</b>	Phe	F
<b>Prolin</b>	Pro	P
<b>Serin</b>	Ser	S
<b>Threonin</b>	Thr	T
<b>Tryptophan</b>	Trp	W
<b>Tyrosin</b>	Tyr	Y
<b>Valin</b>	Val	V

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Schematische Darstellung des Zell-basierten Gerinnungsmodels..	6
<b>Abbildung 1.2:</b> FIX Struktur.	8
<b>Abbildung 1.3:</b> Konformationsänderungen innerhalb von FIX durch serielle Kofaktor FVIIIa und Substrat FX Bindung.	11
<b>Abbildung 1.4:</b> AAV Serotypen und ihre Gewebespezifität aufgrund unterschiedlicher Primär- und Sekundärrezeptor Affinitäten.	16
<b>Abbildung 1.5:</b> Mechanismus der humoralen und zellulären Immunantwort nach AAV Gentherapie.	23
<b>Abbildung 2.1:</b> Schematische Abbildung der Anionen-Austausch-Chromatographie zur Aufreinigung vom rekombinanten FIX.	48
<b>Abbildung 2.2:</b> Schema des zeitlichen Ablaufes der Immunisierung durch intramuskuläre Injektion.	58
<b>Abbildung 2.3:</b> Schema des zeitlichen Ablaufes der subkutanen Injektion von FIX Proteinvarianten inklusive Freundschem Adjuvans.	59
<b>Abbildung 2.4:</b> Schema zur Ermittlung der Pharmakokinetik nach intravenöser Injektion von 10 µg rekombinanten FIX Varianten.	60
<b>Abbildung 2.5:</b> Schema zur Ermittlung der Pharmakokinetik nach subkutaner Injektion von 20 µg rekombinanten FIX Varianten.	60
<b>Abbildung 2.6:</b> Zeitlicher Ablauf der AAV Gentherapie in Hämophilie B Mäusen.	61
<b>Abbildung 3.1</b> Darstellung der Aminosäure Substitutionen zur Generierung der verschiedenen FIX Varianten.	64
<b>Abbildung 3.2</b> Die Generierung der Zelllinie HEK293T/LW.	65
<b>Abbildung 3.3</b> <i>In vitro</i> Charakterisierung und Vergleich der mittels Transduktion generierten Einzelzellklone.	67
<b>Abbildung 3.4</b> Überprüfung der Glykosylierung der verschiedenen FIX Varianten.	68
<b>Abbildung 3.5</b> Analyse der Sekretion und dem intrazellulären Transport der mutierten FIX Varianten.	70
<b>Abbildung 3.6</b> Chromatogramme aufgezeichnet während der Anionen-Austausch-Chromatographie zur Aufreinigung der rekombinanten FIX Varianten	71
<b>Abbildung 3.7</b> Bestimmung des Reinheitsgrades der Aufreinigung mittels Massenspektroskopie sowie SDS Page.	72
<b>Abbildung 3.8</b> Vergleich der Lagerungsbedingungen der aufgereinigten FIX Varianten.	74
<b>Abbildung 3.9</b> Die Überprüfung der Funktionalität der rekombinanten FIX Varianten.	75
<b>Abbildung 3.10</b> Bestimmung der Immunogenität der mutierten FIX Proteine nach intramuskulärer Injektion rekombinanter Proteine.	78
<b>Abbildung 3.11</b> Bestimmung der Immunogenität der mutierten FIX Proteine nach subkutaner Injektion rekombinanter Proteine in Kombination mit dem Freundschem Adjuvans.	79
<b>Abbildung 3.12</b> Affinitätsanalyse der aufgereinigten FIX Varianten zum extrazellulären Matrix Molekül Kollagen Typ IV.	80
<b>Abbildung 3.13</b> Pharmakokinetik nach subkutaner Injektion von 20 µg rekombinant aufgereinigten FIX Varianten in Hämophilie B Mäusen.	82

<b>Abbildung 3.14</b> Pharmakokinetik nach intravenöser Injektion von 10 µg rekombinant aufgereinigten FIX Varianten in Hämophilie B Mäusen.....	85
<b>Abbildung 3.15</b> Analyse der Effizienz der Transduktion, sowie Expression nach AAV Genterapie in Hämophilie B Mäusen. ....	87
<b>Abbildung 3.16</b> Die Überprüfung der Effizienz der hyperaktiven FIX Varianten durch Bestimmung der FIX Aktivität. ....	89
<b>Abbildung 3.17</b> Darstellung der Blutungszeit sowie des photometrisch ermittelten Blutverlustes in einem <i>Tail Clip Assay</i> von AAV Genterapie-behandelten Hämophilie B Mäusen. ....	91
<b>Abbildung 3.18</b> Analyse der Effizienz der Transduktion, sowie Expression nach AAV Genterapie in Hämophilie B Mäusen. ....	92
<b>Abbildung 3.19</b> Die Überprüfung der Effizienz der hyperaktiven FIX Varianten durch Bestimmung der FIX Aktivität. ....	93
<b>Abbildung 3.20</b> Darstellung der Blutungszeit sowie des photometrisch ermittelten Blutverlustes in einem Tail Clip von AAV Genterapie behandelten Hämophilie B Mäusen. ....	94
<b>Abbildung 3.21</b> Immunhistochemische Untersuchungen von Lebergeweben AAV gentherapierter Hämophilie B Mäuse. ....	96
<b>Abbildung 3.22</b> Bestimmung der FIX IgG1 Konzentrationen nach Genterapie von Hämophilie B Mäusen.....	97
<b>Abbildung 3.23</b> Analyser der Thrombogenität mittels Konzentrationsbestimmung von D-Dimeren und Thrombin-Antithrombin Komplexen in Plasmen gentherapierter Hämophilie B Mäuse.. ....	98
<b>Abbildung 4.1:</b> SDS Page zuvor aufgereinigter AAV Partikel. ....	113

### 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1:</b> Unterteilung der Schweregrade der Hämophilie anhand verbliebender Gerinnungsfaktor Aktivitäten.....	2
<b>Tabelle 1.2:</b> Aktuelle Hämophilie B AAV Genterapie Studien.....	20
<b>Tabelle 2.1:</b> Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien. ....	27
<b>Tabelle 2.2:</b> Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer.....	29
<b>Tabelle 2.3:</b> Liste der verwendeten Enzyme, Antibiotika und Antikörper. ....	32
<b>Tabelle 2.4:</b> Auflistung der verwendeten Plasmide. ....	33
<b>Tabelle 2.5:</b> Liste der verwendeten kommerziell erhältlichen Kits. ....	34
<b>Tabelle 2.6:</b> Auflistung der verwendeten Zelllinien sowie der Kulturmedien. ....	35
<b>Tabelle 2.7:</b> Schemata für den analytischen sowie präparativen Restriktionsverdau. ....	37
<b>Tabelle 2.8:</b> Schemata für einen Ansatz zur Erzeugung von <i>blunt ends</i> . ....	39
<b>Tabelle 2.9:</b> Schemata eines Ligationsansatzes. ....	39
<b>Tabelle 2.10:</b> Verwendete Primer für die zielgerichtete Mutagenese zur Herstellung der FIX Varianten. ....	40
<b>Tabelle 2.11:</b> Verwendete Primer in der qPCR. ....	43

## 7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Erhard Seifried, sowie Herrn Dr. med. Joachim Schwäble danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des DRK Blutspendedienstes Baden-Württemberg-Hessen anzufertigen zu dürfen, sowie für die Überlassung des für mich sehr interessanten Themas.

Natürlich möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Beatrix Süß als interne Betreuerin an der TU Darmstadt bedanken. Sie haben das Regelement als externe Doktorandin für mich sehr unkompliziert gestaltet und mir mit Ihrer Begeisterung für das Thema nochmal Elan für die letzte Schreibphase gegeben.

Ein großer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. med. Halvard Bönig. Nicht nur für die widerstandslose Übernahme als Zweitgutachter, sondern auch für deinen Einsatz zur Korrektur meiner Arbeit. Darüberhinaus möchte ich dir aber vielmehr dafür danken, dass du soweit an mich geglaubt hast und mich als neues Mitglied in deiner Arbeitsgruppe aufgenommen hast.

Bedanken möchte ich mich aber auch bei Eliza, Gabi, Nina, Jan und Steffi die sich ebenfalls an den Korrekturen beteidigt haben. Aber nicht nur dafür, sondern vor allem für die fachliche und persönliche Unterstützung während meiner Zeit als Doktorandin. Insbesondere bedanken möchte ich mich hierbei auch bei Pati, du hast mich damals in die Arbeitsgruppe eingeführt, mir alle Methoden gezeigt und stets ein offenes Ohr für mich gehabt und ich freue mich schon darauf dich hier bald wiederzusehen. Natürlich darf auch Darja nicht unerwähnt bleiben. Nach ersten „Ängsten“ dir gegenüber und der dann doch recht kurzen Zeit in der wir uns überschritten haben hatten wir beide fachlich wie freundschaftlich sofort zueinander gefunden, schade dass sich unsere Wege so schnell wieder getrennt haben. Natürlich möchte ich mich auch bei allen anderen unerwähnten Kollegen und Kolleginnen für die tolle Zusammenarbeit und stets angenehme und spaßige Atmosphäre im Labor bedanken.

Unter all den zuvor genannten Kollegen und Kolleginnen möchte ich aber insbesondere „Evchen“ hervorheben. Nach einer Weile des kritischen beäugens sind wir zunächst kollegial näher zusammen gewachsen aber viel bedeutsamer ist für mich die daraus entstandene Freundschaft. Du hast stets ein offenes Ohr und egal welche privaten Probleme auf mich einprasselten du warst sofort zur Stelle und ich weiß ich kann mich jederzeit auf dich verlassen. Und das war an dieser Doktorarbeit der größte Gewinn.

Mein allergrößter Dank geht aber an meine Eltern. Ihr habt mich stets unterstützt und standet jederzeit hinter mir egal was auch gewesen ist. Durch euch bin ich zu dem Menschen geworden der ich nun bin und Euch widme ich diese Doktorarbeit.

## 8 Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Frankfurt, den

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Ann-Kathrin Urbanowitz

Geburtstag: 18. August 1985

Geburtstort: Hannover

### Schulausbildung

1996 -2005 Märkische Schule (24.06.2005 Abitur, 2,5)

### Studium

WiSe.2005/2006-SoSe.2006 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf.

WiSe.2006/2007-SoSe.2012 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität-Bochum. Abschluss Diplom Biologin (Note 1,3). Diplomarbeit im Fachbereich Molekulare Zellbiologie bei Prof. Dr. Stefan Wiese mit dem Titel: Räumlich-zeitliches Expressionsmuster von Phosphacan im Rückenmark der Maus und dessen Funktion beim Wachstum von kultivierten Motoneuronen.

### Promotion

10.2012 - 04.2014 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Biochemie, Iniversitätsklinik Münster (Arbeitsgruppenleiter PD. Dr. Daniela Seidler). Thema: Einfluss von Decorin auf die T-Zell Entwicklung.



05.2014 - 02.2020 Doktorarbeit am DRK Blutspendedienst BaWü-Hessen, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Goethe-Universität, Frankfurt am Main (Arbeitsgruppenleiter Dr. med. Joachim Schwäble). Thema: Potential hyperaktiver Gerinnungsfaktor IX Varianten für den Einsatz in der Hämophilie B Therapie.

Seit 03.2020 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am DRK Blutspendedienst BaWü-Hessen, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Goethe-Universität, Frankfurt am Main (Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. med. Halvard Bönig).

## 10 Publikationen und Kongressteilnahme

**Urbanowitz AK**, Milanov P, Quade-Lyssy P, Abriss D, Seifried E, Schüttrumpf J, Schwäble J. *Novel hyperactive FIX variants and their potential for hemophilia B gene therapy*. In preparation

Kumar AV, Katakam SK, **Urbanowitz AK**, Götte M. Heparan sulphate as a regulator of leukocyte in inflammation. *Curr Protein Pept Sci*. 2015; DOI: 10.2174/1573402111666150213165054

Bocian C, **Urbanowitz AK**, Owens RT, Iozzo RV, Götte M, Seidler DG. *Decorin potentiates interferon- $\gamma$  activity in a model of allergic inflammation*. *J Biol Chem*. 2013; DOI: 10.1074/jbc.M112.419366

**64<sup>th</sup> Annual ISTH SSC Meeting, Dublin, Irland (Juli 2018)** – Poster Präsentation: “Novel hyperactive FIX variants and their potential for haemophilia B gene therapy”  
**Travel Grant Award**